

Санкт-Петербургский государственный университет

АГЕЕВ Сергей Вадимович

Выпускная квалификационная работа

***Функционализация оксида графена аминокислотой L-метионин: синтез,
характеризация и изучение биосовместимости***

Уровень образования: магистратура

Направление 28.04.04 «Наносистемы и наноматериалы»

Основная образовательная программа ВМ.5724.2019 «Фундаментальные и прикладные
аспекты наноматериалов и нанотехнологий»

Научный руководитель:

д. х. н., профессор, заведующий кафедрой
химии твёрдого тела Мурин Игорь Васильевич

Рецензент:

д. х. н., профессор, профессор кафедры
физической химии СПбГТИ (ТУ) Чарыков
Николай Александрович

Санкт-Петербург

2021 год

Оглавление

Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	7
1.1. Основные виды графена и его производных.....	8
1.2. Биомедицинское изучение ОГ и его аддуктов	9
2. Экспериментальная часть.....	14
2.1. Реагенты	14
2.2. Синтез.....	15
2.2.1. Синтез ОГ	15
2.2.2. Синтез ГФМ.....	15
2.3. Характеризация ОГ и ГФМ.....	17
2.4. Компьютерное моделирование	17
2.5. Изучение биосовместимости ГФМ	18
2.5.1. Гемолитическая активность	18
2.5.2. Константа фотодегградации Радахлорина	18
2.5.3. Антирадикальная активность.....	18
2.5.4. Агрегация тромбоцитов.....	19
2.5.5. Связывание с ЧСА.....	19
2.5.6. Генотоксичность.....	20
2.5.7. Цитотоксичность	20
2.6. Распределение по размерам и ζ -потенциалы наночастиц ГФМ.....	20
2.7. Статистический анализ	21
3. Обсуждение результатов	21
3.1. Идентификация материалов.....	21
3.1.1. Рентгеноструктурный анализ.....	21
3.1.2. ИК-спектроскопия.....	22
3.1.3. ТГА	24

3.1.4. РФЭС	24
3.1.5. Рамановская спектроскопия.....	28
3.1.6. СЭМ и ВРЭМ.....	29
3.2. Компьютерное моделирование	31
3.3. Распределение по размерам и ζ -потенциалы наночастиц ГФМ.....	33
3.4. Изучение биосовместимости	34
3.4.1. Гемолитическая активность	34
3.4.2. Фотовыцветание	35
3.4.3. Антирадикальная активность.....	37
3.4.4. Агрегация тромбоцитов.....	38
3.4.5. Связывание с ЧСА.....	39
3.4.6. Генотоксичность.....	40
3.4.7. Цитотоксичность	42
Основные результаты и выводы	44
Благодарности.....	45
Список цитированной литературы	46

Введение

Однослойная плоская наноструктура из атомов углерода толщиной в один атом произвела революцию в области нанотехнологий с момента её открытия. Графен является двумерным sp^2 -гибридизированным гексагональным наноматериалом, открытым в 2004 г. А. Геймом и К. Новосёловым. Графен обладает уникальной теплопроводностью, оптическими, электрическими и магнитными свойствами. Графен — самый тонкий из известных человеку материалов толщиной в один атом, а также невероятно прочный (примерно в 200 раз прочнее стали). Кроме того, он является отличным проводником тепла и электричества. Графен можно модифицировать различными элементами для получения материалов с разнообразными свойствами. К настоящему времени разработано большое количество методов лабораторных способов получения графена. Первым из них является механическая эксфолиация («метод скотча»), используемая для выделения чистого бездефектного графена в научно-исследовательских целях. Кроме того, существуют самые разнообразные методы синтеза, такие как химическое осаждение из паровой фазы, пиролиз, химический синтез, дуговой разряд, раскрытие углеродных нанотрубок, сольвотермический, молекулярно-лучевая эпитаксия и т.д. Однако следует отметить, что, как и для других углеродных наноматериалов, основной проблемой практического применения графена является его несовместимость с водой и водными растворами. В связи с этим актуальной задачей является разработка методов функционализации поверхности графена для получения стабильных водных дисперсий.

К настоящему времени одним из наиболее изученных производных графена является оксид графена (ОГ), в котором кислородсодержащие функциональные группы (эпоксидные, гидроксильные, карбонильные и карбоксильные группы) расположены на поверхности графена. ОГ может быть подвергнут дальнейшей модификации с использованием ковалентных и нековалентных подходов с образованием конъюгатов с аминами, карбоновыми кислотами, полимерами и биомолекулами. Следует отметить, что согласно данным наукометрической базы данных Scopus наблюдается значительный рост числа публикаций, посвящённых изучению графена и ОГ (Рис. 1).

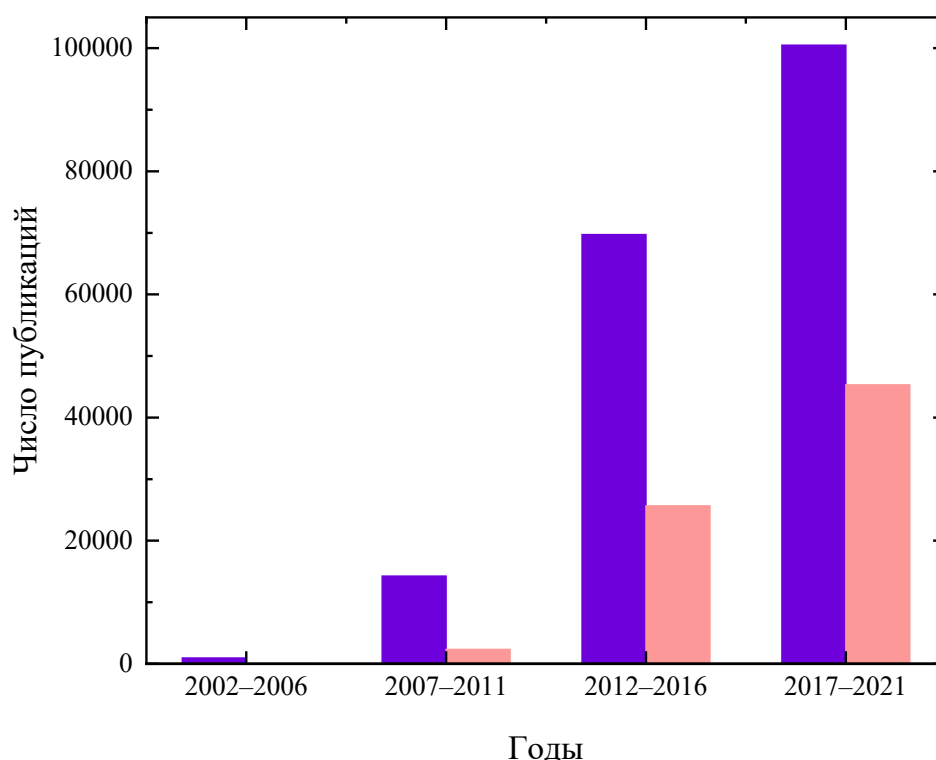


Рис. 1. Распределение публикаций, посвящённых изучению графена (левый столбец) и ОГ (правый столбец).

Целью данной работы является синтез и идентификация аддукта оксида графена с аминокислотой L-метионин (ГФМ), а также изучение физико-химических и биологических свойств полученного соединения. Для достижения этой цели необходимо решить следующие задачи:

- проведение синтеза ГФМ посредством реакции амидирования ОГ;
- проведение идентификации полученного аддукта при помощи комплекса физико-химических методов, включая рентгеноструктурный анализ, ИК-спектроскопию, термогравиметрический анализ, рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию (РФЭС), Рамановскую спектроскопию, сканирующую электронную (СЭМ) и просвечивающую электронную микроскопию высокого разрешения (ВРЭМ), а также распределение частиц ГФМ по размерам и ζ -потенциалы;
- комплексное изучение биосовместимости, включающее исследование гемосовместимости (гемолиз эритроцитов, агрегация тромбоцитов), фотовыцветания,

антирадикальной активности, связывание с человеческим сывороточным альбумином, гено- и цитотоксичности;

— компьютерное моделирование бинарной системы ГФМ–H₂O методом классической молекулярной динамики.

1. Обзор литературы

Графен представляет собой двумерный лист sp^2 -гибридизованных атомов углерода, расположенных в сотовоподобной структуре. Было показано, что он обладает многими свойствами, такими как высокая механическая прочность [1], электрическая проводимость [2] и др. Однако использование чистого графена оказалось сложной задачей из-за сложного синтеза, плохой растворимости соединения и агломерации в растворе из-за Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. В качестве альтернативного соединения, сходного по структуре с графеном, можно синтезировать из графита или других источников углерода нисходящим методом, чтобы достичь многих преимуществ чистого графена, одновременно наполняя поверхность функционализированными кислородными группами. Окисление графита в протонированных растворителях приводит к оксиду графита, который состоит из множества слоёв ОГ.

ОГ имеет гексагональную структуру углерода, аналогичную графену, но также содержит кислородсодержащие функциональные группы, а именно гидроксильные ($-OH$), эпоксидные ($C-O-C$), карбонильные ($C=O$), карбоксильные ($-COOH$) и др. [3]. Помимо относительной простоты синтеза, данные группы обеспечивают множество преимуществ по сравнению с графеном, включая более высокую растворимость [2] и возможность функционализации поверхности, которые открывают множество возможностей для использования в нанокompозитных материалах. Кроме того, ОГ можно обработать рядом методов для синтеза восстановленного оксида графена (ВОГ) с целью минимизировать количество кислородных групп и достичь свойств, близких к свойствам чистого графена [4]. Кроме того, относительно новым видом производных графена являются графеновые квантовые точки (ГКТ), которые представляют собой листы графена с размером <100 нм; они используют уникальные краевые эффекты графена. Производные графена (ОГ, ВОГ, ГКТ) оказались эффективными наполнителями в полимерных нанокompозитных материалах благодаря своим идеальным свойствам материала и диспергируемости в полимерных матрицах [12,13], что привело к множеству возможностей применения. Было показано, что плотная упаковка атомов углерода sp^2 служит идеальным барьером для молекул газа [3,14], что демонстрирует её использование в упаковочных материалах [12], защите чувствительных электронных устройств [14] или в качестве антикоррозионного

покрытия [15,16]. По аналогичным причинам регулирование содержания наполнителя в нанокompозитах может использоваться для изменения селективности молекул определённого размера при создании мембранных технологий [17,18]. Кроме того, уникальные гидрофильные, термические и электрические свойства ОГ могут быть использованы в самых разнообразных материалах [19–21].

1.1. Основные виды графена и его производных

При рассмотрении методов синтеза графена и его производных следует отметить, что структура и свойства в значительной степени зависят от размера, формы и природы функциональных групп, прикреплённых к поверхности материала. Бездефектной структурой является однослойный графен, состоящий из sp^2 -гибридизованных атомов углерода толщиной один атома (Рис. 2а). Однако из-за склонности листов графена к агрегации образуется многослойная структура графена (Рис. 2б). При подходе «сверху вниз» возможно получение окисленной формы графена (ОГ) с sp^2 - и sp^3 -гибридизованными атомами углерода, функционализированными кислородными группами (Рис. 2в). При восстановлении (ВОГ) возможно удаление большей части функциональных групп и sp^3 -гибридизованных атомов углерода для получения графеноподобного материала (Рис. 2г). И ОГ, и ВОГ могут быть затем модифицированы для получения квантовых точек ОГКТ (Рис. 2д) и ВОГКТ (Рис. 2е), соответственно.

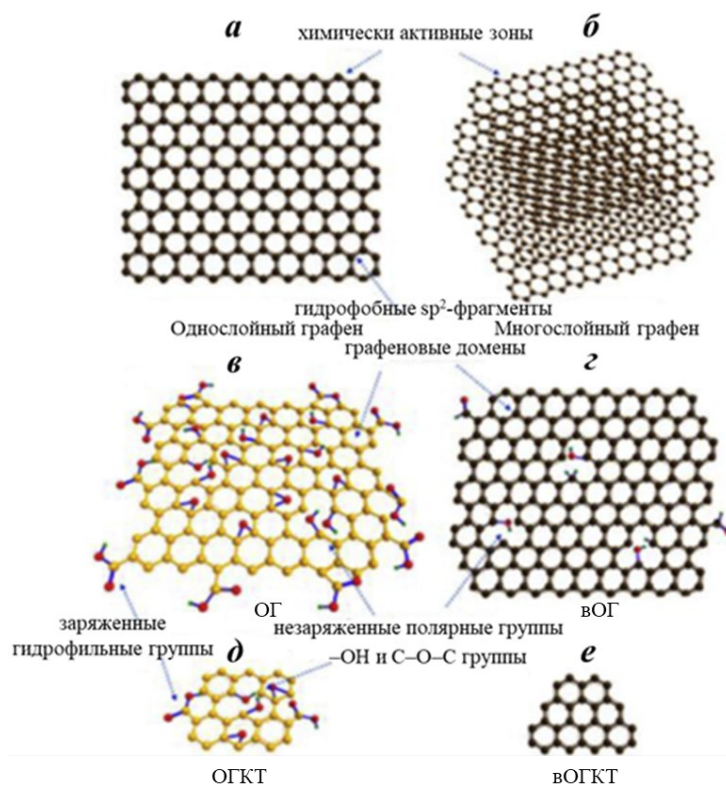


Рис. 2. Различные формы графена и его производных: (а) однослойный графен, (б) многослойный графен, (в) ОГ, (г) вОГ, (д) ОГКТ, (е) вОГКТ [5].

Основные методы синтеза ОГ были предложены Броди [6], Штаудинмайером [7] и Хаммерсом [8]. Графен и ОГ могут быть ковалентно и нековалентно модифицированы через sp^2 -атомы углерода (ароматические домены) и sp^3 -атомы углерода (алифатические домены с кислородными функциональными группами в ОГ) [9]; такая функционализация позволяет проводить модификацию органическими и неорганическими молекулами [10]. Например, иммобилизация белков и ферментов на поверхности ОГ может быть проведена ковалентно через реакцию амидирования между аминогруппами ферментов или белков и карбоксильными группами ОГ, или нековалентно через π - π -стэкинг между ОГ и белками или ферментами [11]. Кроме того, недавние исследования показали возможность функционализации поверхности ОГ различными аминокислотами, такими как фенилаланин, глутаминовая кислота, лизин, цистеин, аргинин, триптофан [12] и аспарагиновая кислота [13]. Основные методы получения ОГ представлены на Рис. 3 [14].

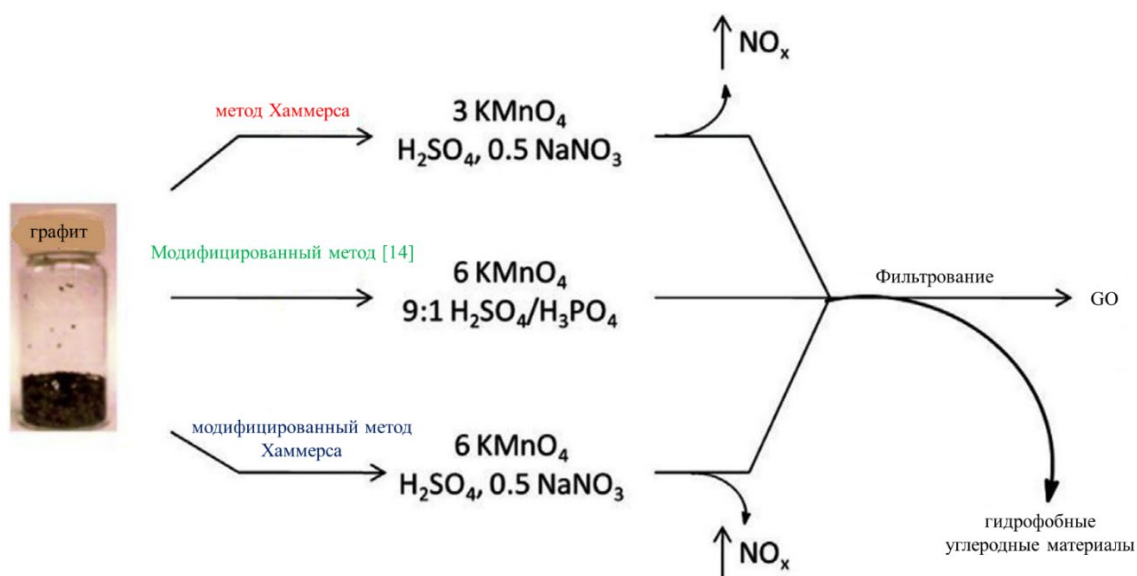


Рис. 3. Схема наиболее распространённых методов синтеза ОГ [14].

1.2. Биомедицинское изучение ОГ и его аддуктов

Авторы работ [11–13,15,16] продемонстрировали возможность ковалентной функционализации ОГ с помощью аминокислот (глутаминовая кислота, фенилаланин, лизин, цистеин, триптофан, аргинин и аспарагиновая кислота), белков (овальбумин, авидин и β -лактоглобулин) и ферментов посредством реакции амидирования между

аминогруппами аминокислоты, фермента или белков и карбоксильных групп ОГ. В то же время нековалентная модификация поверхности ОГ может осуществляться посредством π - π -стэкинг-взаимодействия между ОГ и аминокислотами, белками или ферментами [11].

С момента публикации Liu с соавт. обзорной статьи, посвящённой использованию ОГ) в качестве эффективного наноносителя для доставки лекарств [17], была проведена большая работа по изучению его применения при создании материалов широкого биомедицинского назначения: от доставки лекарств/генов, биологических сенсоров, биоимиджинга и антибактериальных материалов до биосовместимых скаффолдов для тканевой инженерии. Интенсивные исследования биологических свойств графена и его производных обусловлены различными уникальными свойствами, такими как высокая удельная поверхность ($2630 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$), исключительная электронная проводимость (подвижность носителей заряда $200000 \text{ см}^2 \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$), теплопроводность ($\sim 5000 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$), механическая прочность (модуль Юнга $\sim 1100 \text{ ГПа}$), биосовместимость, низкая стоимость и масштабируемое производство, а также лёгкость функционализации [18,19]. Оксид графена, полученный путём окисления графита в жёстких условиях по методу Хаммерса [23], является идеальным наноносителем для эффективной доставки лекарств и генов и обычно содержит от одного до трёх слоёв (толщиной 1–2 нм) размером от нескольких нанометров до нескольких сотен нанометров [19, 24, 25]. Уникальные структурные особенности, такие как плоское строение наноматериала за счёт sp^2 -гибридных атомов углерода, высокая удельная площадь поверхности, которая обогащена кислородсодержащими группами, обеспечивают превосходную биосовместимость ОГ, стабильность водных дисперсий, а также возможность проводить дальнейшую функционализацию, используя методы химической конъюгации или физической адсорбции. Кроме того, реакционноспособные функциональные группы $-\text{COOH}$ и $-\text{OH}$ позволяют проводить конъюгирование с различными молекулами, такими как полимеры [26], лиганды для адресной доставки [25], нуклеиновые кислоты [27], белки [28–30], квантовые точки [31], магнитные наночастицы [32, 33]. По аналогии с исследованиями о доставке лекарств углеродными нанотрубками [34–38] Liu с соавт. [22] впервые исследовал наноразмерный оксид графена в качестве нового и эффективного наноносителя для доставки нерастворимых в воде противоопухолевых препаратов. В предложенном

подходе наноразмерный ОГ сначала конъюгировали с концевой аминогруппой, содержащей полиэтиленгликоль (PEG), после чего иммобилизовали водонерастворимое противораковое лекарственное средство 7-этил-10-гидроксикамптотecin (SN38) при помощи физической адсорбции. В другой работе та же группа изучала направленную доставку препарата Ритуксана, конъюгированного с наноразмерным ОГ–PEG [25]. При этом было установлено, что высвобождение лекарственного средства с поверхности наноразмерного ОГ зависело от pH. Zhang с соавт. [39] исследовал возможность использования ОГ в качестве наноносителя для контролируемой направленной доставки доксорубина и камптотецина с использованием фолиевой кислоты в качестве вектора для адресной доставки. Было обнаружено, что введение лиганда фолиевой кислоты обуславливает специфическую направленность и значительно более высокую цитотоксичность для клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), экспрессирующих рецепторы к фолиевой кислоте (по сравнению с неопухолевыми клетками). Направленная доставка доксорубина при помощи ОГ была также успешно проведена в работах [40, 41]. Yang с соавт. [42] сообщил о синтезе слоёв ОГ, функционализированных Fe_3O_4 (ОГ– Fe_3O_4), и о применении полученных композитов для доставки лекарственных средств. В частности, авторы показали, что полученные конъюгаты ОГ– Fe_3O_4 способны уничтожать клетки рака молочной железы SK3. Zhou с соавт. [43] синтезировал конъюгаты ОГ со следующими аминокислотами: фенилаланин, глутаминовая кислота, триптофан, цистеин, лизин и аргинин. Авторами было показано, что функционализация ОГ аминокислотами может осуществляться посредством реакции восстановления, гидрофобных или электростатических взаимодействий, а также за счёт образования водородных связей. Таким образом, в зависимости от типа функционализации и природы аминокислоты можно влиять на гидрофобность поверхности и поверхностный заряд наноматериала. Дополнительно авторы работы установили возможность иммобилизации фермента липазы на поверхности ОГ, функционализированного аминокислотами, посредством физической адсорбции. На основе полученных экспериментальных данных было установлено, что адсорбция фермента липазы на поверхности ОГ подчиняется изотерме адсорбции Фрейндлиха [43]. John с соавт. [44] изучил методом теории функционала плотности (DFT) электронные свойства зигзагообразной графеновой наноленты,

функционализированной L-валином и L-серином. Проведённые исследования позволяют предположить возможность применения данных структур для биоимиджинга, доставки лекарств, а также в качестве агентов для тераностики [44]. Hurt с соавт. [45] установил, что оксид графена демонстрирует значительные антиоксидантные свойства по отношению к гидроксильному и супероксидному радикалам. Кроме того, было показано, что, несмотря на меньшую удельную поверхность, графен, состоящий из нескольких слоёв, более активен по сравнению с монослоями ОГ. Данный факт авторы связали с тем, что на антиоксидантные свойства графена в большей степени влияет сопряжённая система, состоящая из атомов углерода в sp^2 -гибридизованном состоянии, чем наличие на поверхности кислородсодержащих функциональных групп.

Функционализированные графеновые наноматериалы обладают повышенной биосовместимостью [20–24], а потенциальные области применения варьируются от доставки лекарств / генов [25], биовизуализации [26,27] и тканевой инженерии [28] к разработке антибактериальных [29], противогрибковых [30] и противовирусных материалов [31]. Также стоит упомянуть о применении графеновых материалов для доставки противораковых препаратов [32]. Его высокая площадь поверхности позволяет графену доставлять доксорубицин непосредственно в опухоль [32–34]. Кроме того, его можно использовать в диагностике рака и в области биосенсоров, которые могут использоваться в качестве индикаторов рака на ранней стадии [35–38]. Более того, наноматериалы на основе графена могут действовать как биомаркеры для селективного обнаружения активных форм кислорода в живых клетках [36] и ДНК в растворах [39,40]. Композиты графен и ОГ, включая магнитные наночастицы Fe_3O_4 , также могут применяться в качестве носителей противораковых препаратов, нуклеотидов / пептидов и флуоресцентных агентов. [32,34].

Модификация ОГ полиакриловой кислотой и полиэтиленгликолем приводит к сохранению жизнеспособности линии клеток макрофагов мыши J774A.1 по сравнению с исходным ОГ. Кроме того, авторы изучили биораспределение, токсичность, выживаемость, гематологические и биохимические параметры крови, провоспалительные реакции, формирование фиброза лёгких и продемонстрировали удовлетворительную биосовместимость полученных наноматериалов на мышинной модели BALB/c [41]. Yan с соавт. продемонстрировали хорошую биосовместимость

наноматериалов на основе ОГ-полианилин в экспериментах по пролиферации линии клеток мышинового фибробласта L-929 [42].

Sai с соавт. показали, что ОГ, функционализированный бычьим сывороточным альбумином, имеет улучшенную гемосовместимость по сравнению с ОГ, с коэффициентом гемолиза ниже 0.2 % [43]. Geng с соавт. объяснил, что частично фторированный графен снижает адгезию эритроцитов к поверхности графена, что приводит к улучшению биосовместимости [44].

Qiu с соавт. исследовал активность ОГ, восстановленного оксида графена и многослойного графена по отношению к различным активным формам кислорода (гидроксил-радикал, супероксид-радикал, пероксил-радикал) и стабильным радикалам: 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) и 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота). Эксперименты показали, что ОГ является эффективным поглотителем радикалов •ОН и может защищать водорастворимые красители и спиновые ловушки от окисления [45].

В данной работе впервые был разработан метод ковалентной функционализации ОГ аминокислотами на основе реакции амидирования. На примере синтеза производного ОГ с L-метионином было показано, что преимущества этого подхода включают простые процедуры, недорогие реагенты и высокий выход. В свою очередь, ОГ был получен с помощью масштабируемого метода Хаммерса и Оффемана благодаря его простоте, высокому качеству получаемого материала и высокой степени конверсии графита [8]. Полученный материал был охарактеризован с помощью физико-химических методов, таких как рентгеноструктурный анализ, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС), инфракрасная (ИК), Рамановская спектроскопия, термогравиметрический анализ (ТГА), сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) и просвечивающая электронная микроскопия высокого разрешения (ВРЭМ). Исследование биосовместимости включало гемолиз эритроцитов и агрегацию тромбоцитов человека, фотовыцветание фотосенсибилизатора, антирадикальную активность, связывание с сывороточным альбумином человека (ЧСА), цитотоксичность с использованием линии клеток эмбриональной почки человека (НЕК293) и генотоксичность на модели мононуклеарных клеток периферической крови человека (РВМС). С помощью метода DFT и молекулярной

динамики (МД) были получены структурные и динамические характеристики бинарной системы ГФМ–вода.

2. Экспериментальная часть

2.1. Реагенты

Для проведения синтеза и исследования биосовместимости ГФМ были использованы следующие реагенты: графит, нитрат натрия, перманганат калия, серная кислота, соляная кислота, пероксид водорода, L-метионин, тионилхлорид, диметилформамид (ДМФА), дихлорметан, этанол, деионизированная вода, Радахлорин,ДФПГ, ЧСА, аденозиндифосфат (АДФ), диметилсульфоксид (ДМСО) и азид натрия (см. таблицу 1). Деионизированная вода (электропроводность $5,5 \cdot 10^{-6}$ См·м⁻¹) была использована для синтеза и биомедицинских исследований. Очистку воды проводили на аппарате Millipore Simplicity UV (Merck, Германия).

Таблица 1. Используемые реагенты.

Реагент	Производитель	Чистота
Графит	МСТ “Nano”, Россия	99,999 %
Нитрат натрия	Merck, США	≥ 99 %
Перманганат калия	Merck, США	≥ 99 %
Серная кислота	Merck, США	≥ 98 %
Соляная кислота	Merck, США	≥ 30 %
Пероксид водорода	Merck, США	≥ 30 %
L-Метионин	Merck, США	≥ 99 %
Тионилхлорид	Merck, США	≥ 99 %
ДМФА	Merck, США	≥ 99 %
Дихлорметан	Merck, США	≥ 99 %
Этанол	Merck, США	≥ 99 %
Радахлорин	“Рада-Фарма”, Россия	
ДФПГ	Merck, США	≥ 97 %
ЧСА	Биолот, Россия	≥ 95 %
ДМСО	Merck, США	≥ 99,7 %
Азид натрия	Merck, США	≥ 99.5 %

2.2. Синтез

2.2.1. Синтез ОГ

ОГ был синтезирован из графита путём реакции окисления модифицированным методом Хаммерса и Оффемана (Рис. 4). [8]. Графитовый порошок (3 г) диспергировали в концентрированной серной кислоте (200 мл) на ледяной бане при перемешивании в течение 30 мин. Затем медленно добавляли твёрдый KMnO_4 (8 г) при непрерывном перемешивании в течение 45 мин с последующим добавлением NaNO_3 (2 г) при перемешивании в течение 2 ч при 5 °С. Затем реакционную смесь перемешивали в течение 90 мин при 96 °С при постепенном добавлении деионизированной воды (200 мл). Дополнительные порции деионизированной воды (350 мл) и 30 % H_2O_2 (10 мл) были добавлены для завершения процесса окисления и удаления избытка KMnO_4 . Остаток ОГ отделяли фильтрованием, многократно промывали 5% раствором HCl и деионизированной водой до нейтрального значения pH. Осадок сушили при 65 °С в течение 5 ч, повторно диспергировали в деионизированной воде при ультразвуковой обработке в течение 1 ч, а затем центрифугировали (20 мин при 4000 об/мин). В результате были получены красновато-коричневые слои оксида графена с выходом 90 %. Полученное вещество хранили в темноте в эксикаторе при комнатной температуре.

2.2.2. Синтез ГФМ

Порошок ОГ (100 мг) диспергировали в ДМФА (5 мл) с помощью ультразвука в течение 15 мин, и смесь кипятили с обратным холодильником с SOCl_2 (25 мл) при 65 °С в течение 24 ч, чтобы получить функционализированный ацилхлоридом оксид графена ($\text{ОГ}-\text{COCl}$). (Рис. 5, *i*). Затем реакционную смесь перегоняли для удаления избытка SOCl_2 . $\text{ОГ}-\text{COCl}$ промывали хлористым метиленом, а затем сушили при 85 °С в течение 5 ч. Дисперсию L-метионина (100 г) в ДМФА (15 мл) кипятили с $\text{ОГ}-\text{COCl}$ при 85 °С в течение 24 ч (Рис. 5, *ii*). ОГ, функционализированный L-метионином, фильтровали, промывали хлористым метиленом и деионизированной водой и сушили при 65 °С в течение 10 ч. Выход реакции составил 85 %. Полученное вещество хранили в темноте в эксикаторе при комнатной температуре.

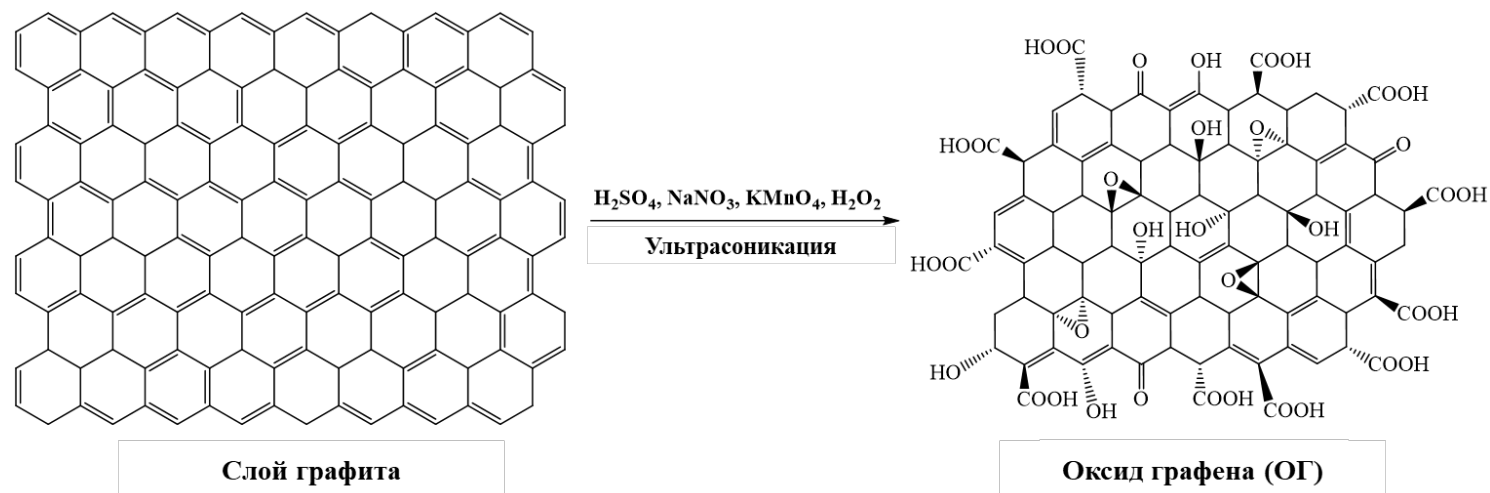


Рис. 4. Схема синтеза ОГ (Метод Хаммерса и Оффемана).

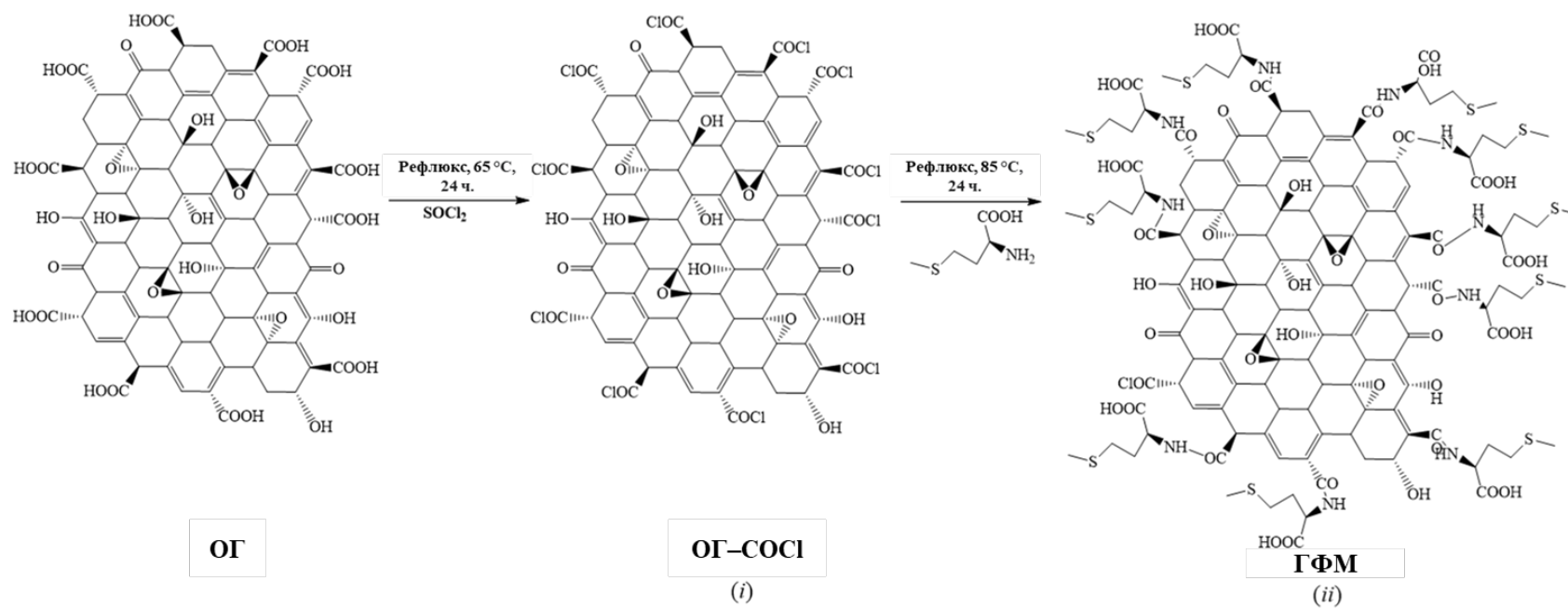


Рис. 5. Схема синтеза функционализированного ацилхлоридом оксида графена (i) и ГФМ (ii).

2.3. Характеризация ОГ и ГФМ

Рентгеновский порошковый дифрактометр Rigaku «MiniFlex II» (Япония) был использован для рентгеноструктурного анализа графита, ОГ и ГФМ. Рамановский анализ проводили на Рамановском спектрометре Horiba Jobin-Yvon LabRam HR800 (Япония). ИК-спектроскопию проводили с помощью ИК-Фурье спектрометра Nicolet 8700 (США). Морфологию полученных ОГ и ГФМ определяли с помощью растрового электронного микроскопа JSM-7001F (Япония) и просвечивающего электронного микроскопа высокого разрешения Zeiss Libra 200FE (Германия). Термическую стабильность образцов измеряли на термогравиметрическом анализаторе NETZSCH TG 209 F1 Libra (Германия) в диапазоне температур 30–1020 °С с использованием чистого азота и скорости нагрева 5 °С·мин⁻¹. Количественный и качественный анализ химического состава ОГ и ГФМ был выполнен с помощью рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС). РФЭС-анализ проводили с использованием комбинированного Оже-, рентгеновского и ультрафиолетового фотоэлектронного спектрометра Thermo Fisher Scientific ESCA^{lab} 250Xi (США) с монохроматическим AlK α -излучением (энергия фотонов 1486,6 эВ). При проведении экспериментов использовалась система компенсации электрон-ионного заряда. Полное энергетическое разрешение составляло 0,3 эВ. Исследование проводилось при температуре окружающей среды в сверхвысоком вакууме (1·10⁻⁹ мбар).

2.4. Компьютерное моделирование

С помощью программы DMol³, реализующей метод DFT, были рассчитаны электронные структуры графена, ОГ и ГФМ. Для расчётов использовались базис DNP и функционал PBE. Рассчитана оптимальная геометрия наночастиц ОГ и ГФМ и определены заряды всех атомов по схеме Малликена. В Табл. 2 показаны заряды модифицированных атомов углерода. На следующем этапе был применён классический подход МД для системы, состоящей из одиночной наночастицы ОГ или ГФМ и 3000 молекул воды в кубической ячейке с периодическими граничными условиями. Длительность расчётов составляла 1 нс с шагом 1 фс при 298.15 К в ансамбле NVT. Использовалось силовое поле UFF, заряды применялись из вышеупомянутых расчётов DFT.

Таблица 2. Заряды атомов углерода в ОГ и ГФМ (в единицах заряда электрона). С-Карбокси — атом углерода карбоксильной группы аминокислоты, связанный с атомом углерода графена, С-Эпокси — атомы углерода графена в эпоксидной группе, С-Карбоксил — атом углерода графена, связанный с атомом углерода карбоксильной группы L-метионина, С-Гидрокси — атом углерода графена, модифицированный гидроксильной группой, С-Карбонил — атом углерода графена, соединённый с атомом кислорода двойной связью.

	С-Карбокси	С-Эпокси	С-Карбоксил	С-Гидрокси	С-Карбонил
ОГ	0,480	0,023	0,023	0,037	0,306
ГФМ	0,370	0,030	0,023	0,038	0,312

2.5. Изучение биосовместимости ГФМ

2.5.1. Гемолитическая активность

После получения информированного согласия были взяты образцы крови для исследования у трёх доноров обоих полов в возрасте 20–30 лет. Исследование гемолиза эритроцитов проводили путём измерения оптической плотности супернатантов при $\lambda = 540$ нм на спектрофотометре Thermo Scientific Evolution 300 (США). Реакционную смесь объёмом 2 мл готовили из 1 мл дисперсии ГФМ с концентрацией 2,5–25 мг·л⁻¹ и 1 мл суспензии эритроцитов в изотоническом растворе хлорида натрия. После приготовления образцы инкубировали при $37 \pm 0,2$ °С в течение 1 и 3 ч. По окончании инкубации пробирки центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин.

2.5.2. Константа фотодеградации Радахлорина

Спектры поглощения дисперсий ГФМ и Радахлорина, раствора NaN₃ и Радахлорина и чистого раствора Радахлорина до и после облучения регистрировали с помощью лазера Laserland LED-2000 ($\lambda = 659$ нм, мощность лазера 55 мВт, Китай). После этого регистрировались оптические плотности в максимумах спектра на длине волны 664 нм. Влияние ГФМ на фотовыцветание Радахлорина оценивали с помощью константы скорости фотодеградации k_{deg} [46,47].

2.5.3. Антирадикальная активность

Для определения антирадикальной активности ГФМ использовали модель ДФПГ [48,49]. Для изучения антирадикальной активности готовили раствор ДФПГ в этаноле и дисперсию ГФМ в воде, после чего растворы смешивали в соотношении 1:1. Концентрация ДФПГ в конечном растворе составляла 0,0276 мг·л⁻¹, концентрация

ГФМ варьировалась от 0,25 до 25 мг·л⁻¹. В качестве отрицательного контроля использовали водно-спиртовой раствор ДФПГ с концентрацией 0,0276 мг·л⁻¹ (без добавления ГФМ). Водно-спиртовые суспензии ГФМ ($C = 0,25\text{--}25$ мг·л⁻¹) использовали в качестве стандарта. После приготовления все растворы помещали в ультразвуковую баню на 10 мин, а затем инкубировали 30 мин в темноте при $T = 298,15$ К. Затем измеряли оптическую плотность растворов по отношению к водно-спиртовой смеси на длине волны 515 нм. Процент ингибирования рассчитывали по Ур. 1:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{A_{\text{ДФПГ}} - (A_{\text{образец}} - A_{\text{контроль}})}{A_{\text{ДФПГ}}} \cdot 100\% \quad (1),$$

где $A_{\text{ДФПГ}}$ — оптическая плотность водно-спиртового раствора ДФПГ в отсутствие ГФМ, $A_{\text{образец}}$ — оптическая плотность водно-спиртового раствора ДФПГ после реакции с ГФМ, $A_{\text{контроль}}$ — оптическая плотность водно-спиртовой дисперсии ГФМ.

2.5.4. Агрегация тромбоцитов

После получения информированного согласия образцы крови для исследования были взяты у трёх доноров обоего пола в возрасте 20–30 лет, которые не получали препараты, влияющие на функцию тромбоцитов, в течение 7–10 дней. Для предотвращения активации тромбоцитов кровь отбирали в вакуумные пробирки, содержащие 3,8 % цитрата натрия в качестве стабилизатора в соотношении цитрат натрия: кровь — 1:9. Для получения плазмы, обогащённой тромбоцитами (PRP), стабилизированную кровь центрифугировали при скорости 3000 об/мин в течение 5 мин. Агрегацию тромбоцитов в PRP изучали с помощью анализатора агрегации тромбоцитов модели Solar AP 2110 (Беларусь) при 37 °С; скорость вращения магнитной мешалки 1200 об/мин. АДФ применяли как индуктор агрегации ($C = 4,27$ мг·л⁻¹). Влияние производного графена на индуцированную агрегацию тромбоцитов определяли путём смешивания 270 мкл PRP и 30 мкл дисперсии ГФМ в кюветах при конечных концентрациях $C = 2,5\text{--}25$ мг·л⁻¹. Индукторы добавляли в кюветы через 5 мин инкубации смеси. Кинетику агрегации записывали до выхода кривой на плато.

2.5.5. Связывание с ЧСА

Связывание ГФМ с ЧСА изучали на микропланшетном спектрофлуориметре Tecan Infinite M200 (Швейцария) [50]. Регистрация эмиссионных спектров проводилась в диапазоне длин волн $\lambda = 310\text{--}450$ нм при длине волны возбуждения 290 нм, температура 298,15 К, точность термостата $\Delta T = \pm 0,01$ К. Для измерения спектров

флуоресценции использовали дисперсии, содержащие $200 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ЧСА и различные концентрации ГФМ ($C = 5\text{--}40 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$).

2.5.6. Генотоксичность

Генотоксичность ГФМ оценивалась методом ДНК-комет, основанным на измерении влияния ГФМ на целостность ДНК мононуклеарных клеток периферической крови человека (РВМС) с помощью щелочного гель-электрофореза [51]. ДНК-кометы визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Micromed 3 LUM (Россия). Измерения длины хвостов проводились с помощью программы CASP (версия 1.2.2). Содержание хвостовой ДНК и длина хвоста были определены экспериментально, и момент хвоста был рассчитан как процент ДНК в хвосте, умноженный на длину между центром головы и хвостом. Этот метод ранее был предложен Olive и соавт. [52].

2.5.7. Цитотоксичность

Для измерения цитотоксичности ГФМ был проведён МТТ-анализ (колориметрический тест с использованием бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) на линии НЕК293 [53]. 10^4 клеток на лунку помещали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение ночи в модифицированной Дульбекко культуральной среде Игла (DMEM) с добавлением 10 % инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки и пенициллин-стрептомицина ($10 \text{ МЕ} \cdot \text{мл}^{-1}$ – $100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$). В этот период клетки прикреплялись к поверхности лунок. После этого в лунки добавляли свежую среду DMEM, содержащую различные концентрации ГФМ, и планшет помещали в инкубатор, влажность 95 %, 20 % O_2 , 5 % CO_2 , 37 °С. Через 48 ч в лунки добавляли 100 мкл DMEM и 20 мкл МТТ-реагента ($0,5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) и продолжали инкубировать в течение 1 ч. Затем удаляли супернатант, образовавшиеся во время восстановления МТТ жизнеспособными клетками кристаллы формазана растворяли в ДМСО и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре BioRad x Marx при $\lambda = 540 \text{ нм}$ (за вычетом оптической плотности фона при $\lambda = 690 \text{ нм}$).

2.6. Распределение по размерам и ζ -потенциалы наночастиц ГФМ

Размеры частиц и ζ -потенциалы ГФМ были получены с использованием Malvern Zetasizer 3000 (Великобритания) при $T = 298,15 \text{ К}$. Значения индекса полидисперсности равны 0,24–0,47.

2.7. Статистический анализ

Все расчёты выполнены в программе OriginLab (США). Значения P считались значимыми при 0,05. Данные были проанализированы с использованием t -критерия Стьюдента. Физико-химические эксперименты проводились трижды. Все биологические эксперименты повторяли десять раз.

3. Обсуждение результатов

3.1. Идентификация материалов

3.1.1. Рентгеноструктурный анализ

Рис. 6 иллюстрирует спектры графита, ОГ и ГФМ. Анализ спектра показывает наличие пика при 2θ $12,2^\circ$, относящегося к плоскости 002. Это доказывает преобразование графита, имеющего плоскость 002 при 2θ $26,5^\circ$. После функционализации ОГ L-метионином пик при $12,2^\circ$ сдвигается до $17,8^\circ$ из-за химической модификации поверхности. [54]. Кроме того, ГФМ имеет пики, относящиеся к сере, при 2θ $23,1^\circ$, $27,7^\circ$, $31,4^\circ$ и $42,8^\circ$ [55] подтверждающие успешную функционализацию ОГ L-метионином.

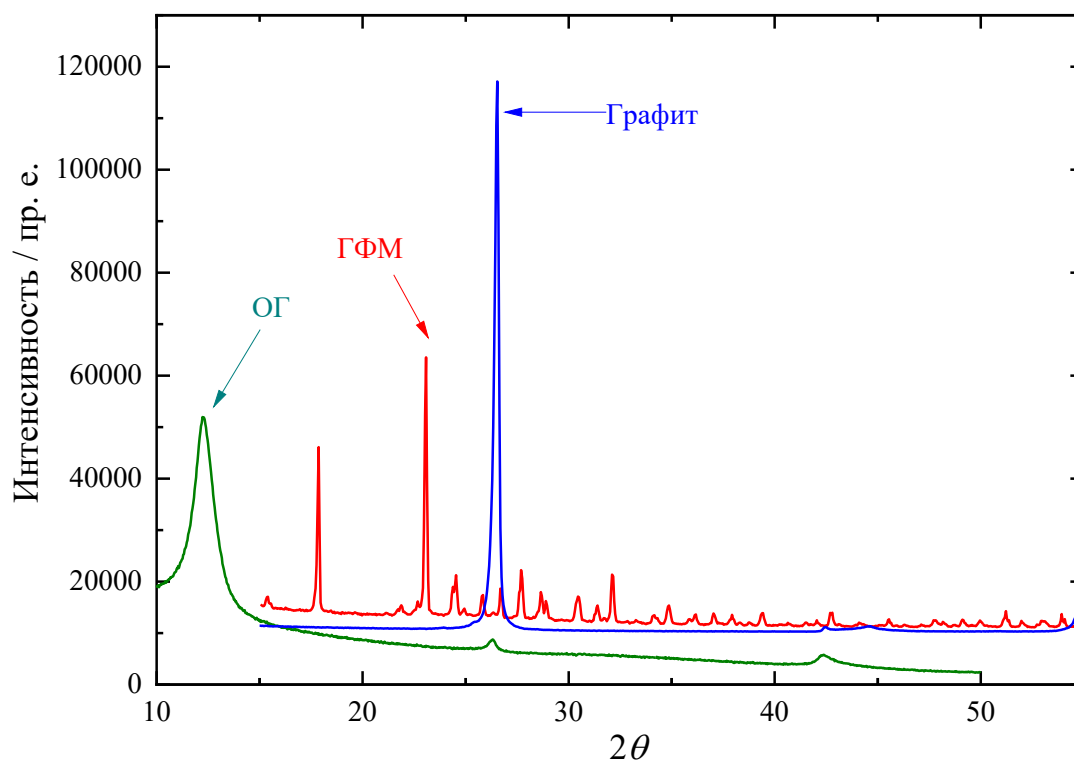


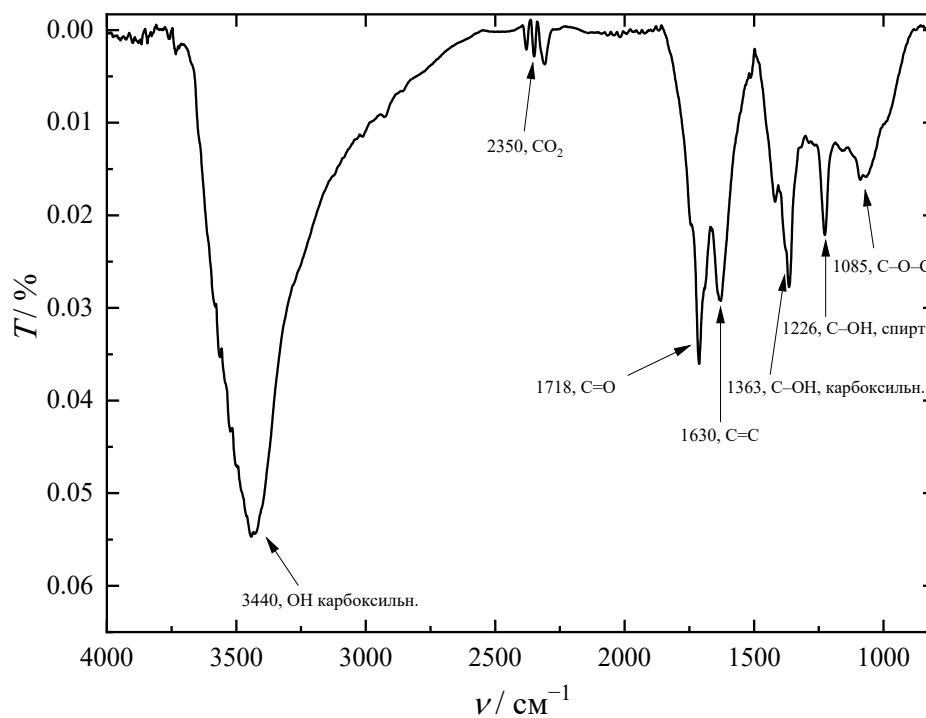
Рис. 6. Рентгеноструктурный анализ графита (—), ОГ (—) и ГФМ (—).

3.1.2. ИК-спектроскопия

Рис. 7а демонстрирует ИК-спектр ОГ, где широкий пик около 3440 см^{-1} может быть связан с фрагментом О–Н карбоксильной группы, кроме того, наличие интенсивного пика при 1718 см^{-1} приписывается участку С=О карбоксильной группы. Кроме того, пик при 1363 см^{-1} относится к С–ОН фрагменту карбоксильной группы. Пик при 1085 см^{-1} относится к фрагменту С–О, соответствующему эпоксидным группам, а также спиртовым группам с пиком при 1226 см^{-1} , относящимся к С–ОН. В то же время наличие пика при 1630 см^{-1} соответствует фрагменту С=С ароматического домена структуры графена [56].

На Рис. 7б представлен ИК-спектр ГФМ, где пик при 3425 см^{-1} приписывается участку N–H амидной группы (образованной между группами NH_2 L-метионина и группами COCl ОГ– COCl) и участку О–Н карбоксильных групп остатков L-метионина. Пик при 1630 см^{-1} приписывается участку С=О амидной группы CONH . Пик, который появляется при 1706 см^{-1} , связан с фрагментом С=О обеих COOH -групп остатков L-метионина и примесью групп COCl . В то же время наличие незначительного пика при 860 см^{-1} соответствует фрагменту С–Cl непрореагировавших ацилхлоридных групп. N–H фрагмент амида присутствует при 1589 см^{-1} . Наличие пиков при 1023 см^{-1} и 885 см^{-1} соответствует С–N и С–S участкам, соответственно. Кроме того, пик при 1257 см^{-1} относится к С–О фрагменту карбоксильных групп (фрагмент С–ОН в остатках L-метионина). Пики при 2980 см^{-1} , 2843 см^{-1} и 2782 см^{-1} связаны с алифатическим С–Н участком L-метионина. Пики при 1468 и 1403 см^{-1} соответствуют фрагменту С–Н CH_2 -групп.

(a)



(б)

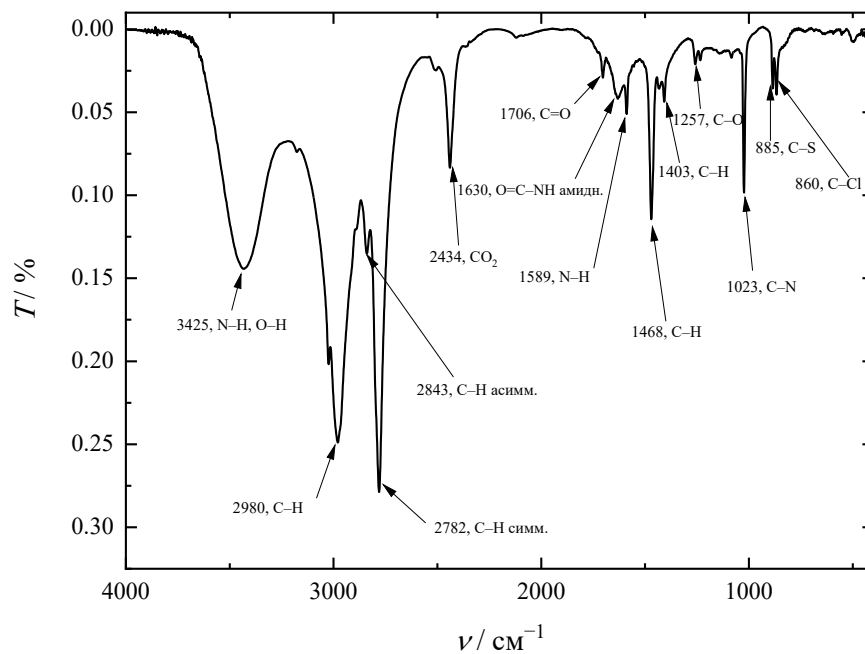


Рис. 7. ИК-спектры ОГ (a) и ГФМ (б).

3.1.3. ТГА

На Рис. 8 показаны кривые термогравиметрии (ТГ) и дифференциальной термогравиметрии (ДТГ) ОГ и ГФМ в диапазоне температур 30–1020 °С. Хорошо заметно, что наночастицы ОГ и ГФМ термически стабильны до 90 °С, дальнейшее повышение температуры приводит к разложению ОГ и ГФМ, связанному с деградацией функциональных групп, различными типами перегруппировки и дальнейшей деградацией поверхности графена (при значительно более высоких значениях температуры). Кроме того, модификация ОГ остатками L-метионина снижает термическую стабильность материала.

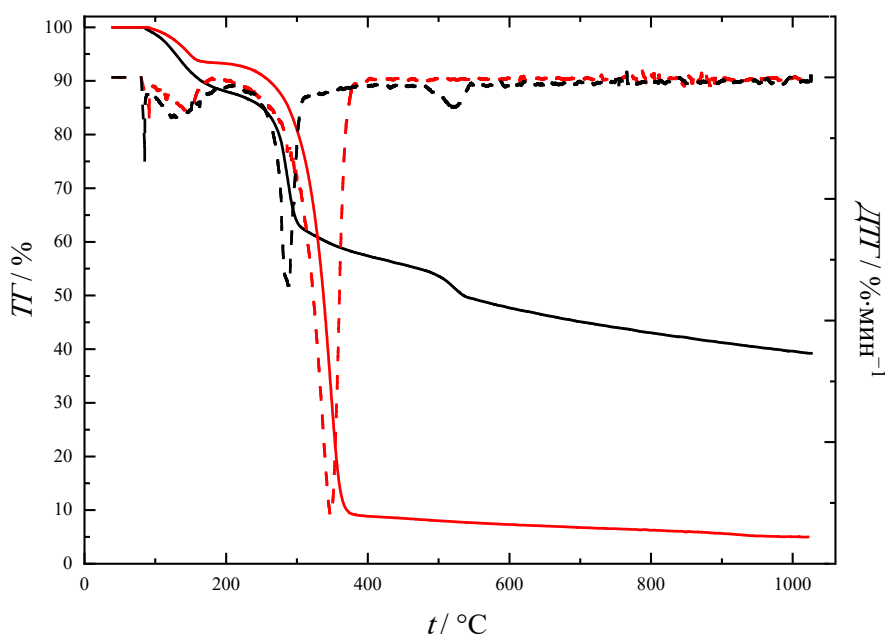


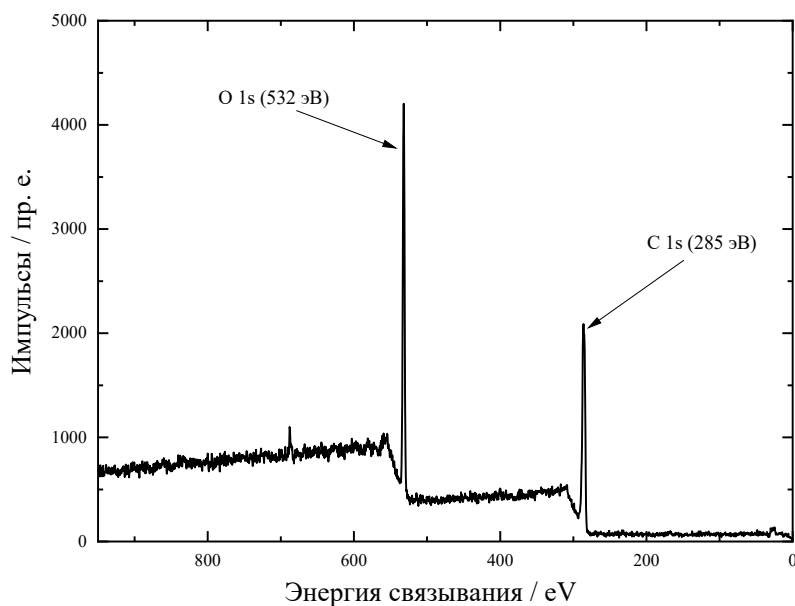
Рис. 8. Термогравиметрический анализ ОГ (чёрный цвет) и ГФМ (красный цвет). ТГ — сплошная линия, ДТГ — пунктирная линия.

3.1.4. РФЭС

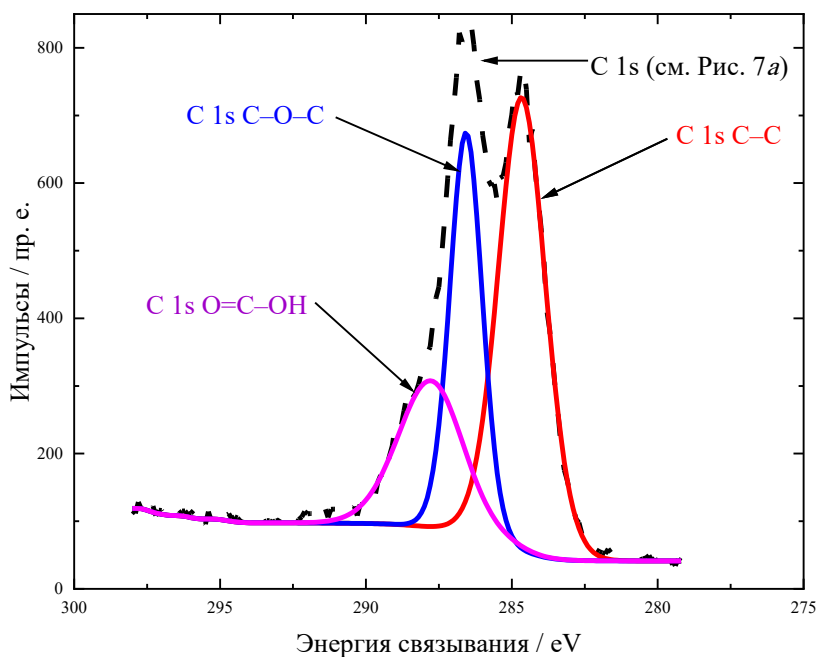
На Рис. 9 представлены результаты РФЭС, которые могут дать представление о количественном и качественном анализе химического состава ОГ. Анализ Рис. 9а показывает, что РФЭС-спектр ОГ содержит линии, соответствующие С 1s при 285 эВ и О 1s при 532 эВ. После деконволюции становится очевидным, что С 1s-спектр ОГ состоит из трех пиков при 284,56, 286,46 и 287,67 эВ, связанных с С–С sp^2 углеродного скелета, С–О–С эпоксидных групп и СООН карбоксильной группы, соответственно (Рис. 9б). Деконволюция О 1s показывает, что линия содержит два пика при 532,2 и

531,13 эВ (Рис. 9в). Первый пик соответствует всем кислородсодержащим функциональным группам (эпокси, карбонильная и карбоксильная), а второй относится к гидроксильным группам (спиртовым и гидроксильным группам в карбоксильных). Атомные проценты различных интенсивностей пиков для С (sp^2): С (эпокси): С (COOH) составляют 48,57: 29,59: 21,48, соответственно, что указывает на то, что более половины атомов углерода на поверхности графена окислены.

(a)



(б)



(в)

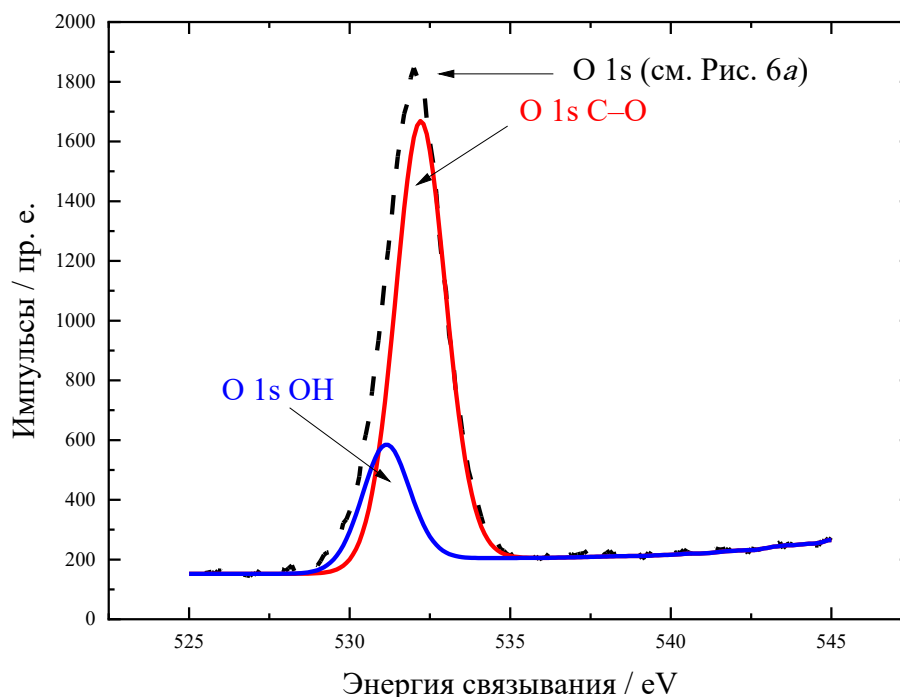
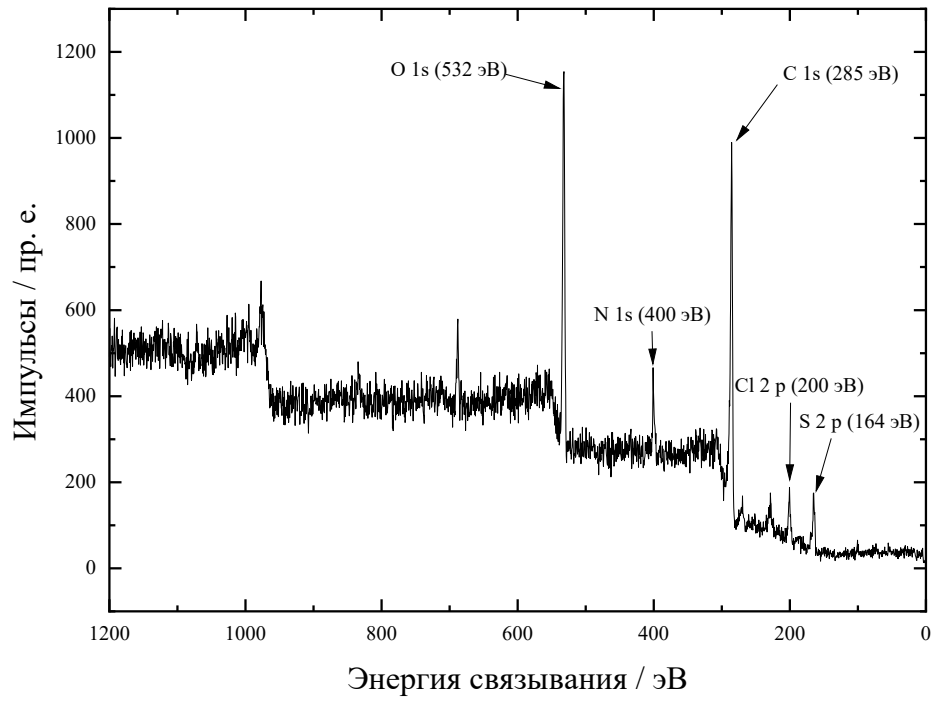


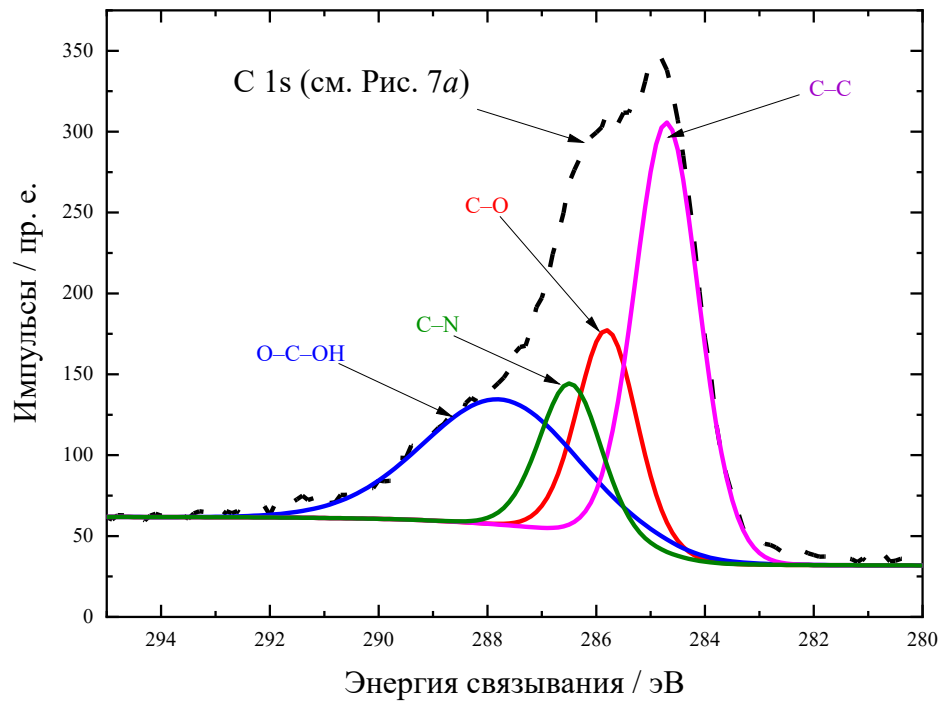
Рис. 9. Спектры РФЭС для ОГ (а), С 1s ОГ (б) и О 1s ОГ (в).

На Рис. 10 представлены результаты исследования ГФМ методом РФЭС. На Рис. 10а представленный спектр состоит из линий О 1s, N 1s, С 1s, Cl 2p, S 2p при 532, 400, 285, 200 и 164 эВ, соответственно. После деконволюции очевидно, что спектр С 1s содержит четыре пика, связанных с углеродным sp^2 -скелетом C–C при 284,7 эВ, карбоксильными группами L-метионина COOH при 287,77 эВ, связями кислород-углерод в карбонильных, эпоксидных и гидроксильных группах при 285,8 эВ, связью C–N при 286,47 эВ (Рис. 10б). В то же время деконволюция О 1s демонстрирует наличие двух пиков: первый — связи кислород-углерод в амидных и карбоксильных группах при 532,41 эВ, второй — кислород-водородная связь карбоксильной группы при 531,25 эВ (Рис. 10в).

(a)



(б)



(б)

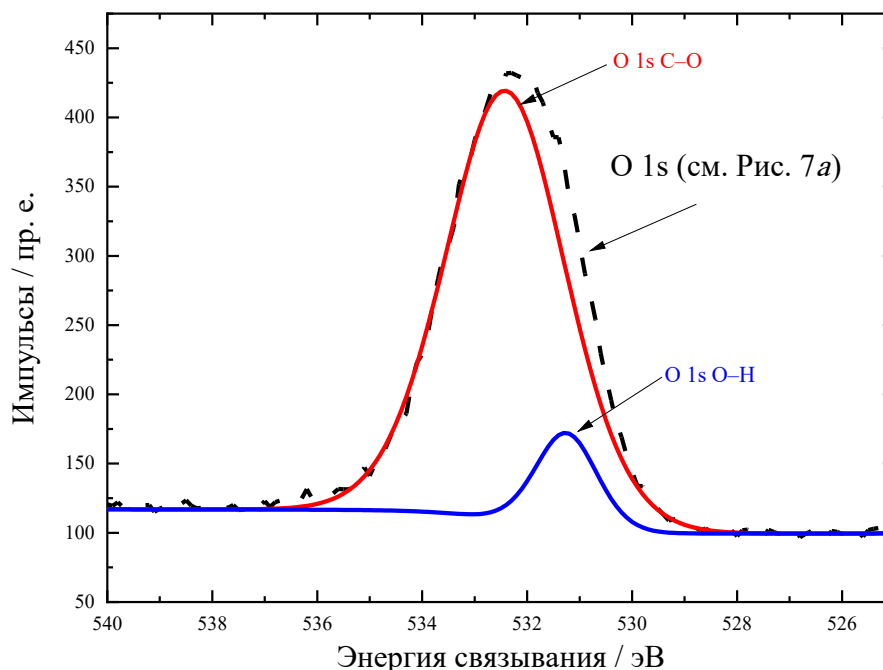


Рис. 10. Спектры РФЭС для ГФМ (а), С 1s ГФМ (б) и О 1s ГФМ (в).

3.1.5. Рамановская спектроскопия

На Рис. 11 показаны результаты Рамановской спектроскопии для ОГ и ГФМ, полученные с использованием лазера с возбуждением на длине волны 514 нм. Спектр содержит полосу D, полосу G и полосу 2D [57]. Полоса G представляет собой область, характерную для всех графитовых материалов с sp^2 -гибридизацией углеродных атомов, она описывает участок C–C атомов углерода, образующих π -структуру, в то время как полоса D описывает дефекты, приводящие к нарушению sp^2 -структуры и частичному преобразованию в атомы углерода с sp^3 -гибридизацией с разупорядочением π -системы и увеличением количества дефектов и сайтов функционализации на поверхности. Полоса 2D описывает количество слоёв графена и определяет, являются ли они однослойными, двухслойными или многослойными. В частности, в случае однослойного ОГ отношение I_{2D} / I_G равно 2; уменьшение этого отношения свидетельствует о росте количества слоёв. Увеличение отношения I_D / I_G описывает наличие дефектов в связи с функционализацией. Анализ Рамановского спектра ОГ (Рис. 11) демонстрирует наличие полос D и G при 1360 см^{-1} и 1592 см^{-1} , соответственно, с отношением $I_D / I_G = 0,97$. В то же время D- и G-полосы ГФМ более

интенсивны и немного смещены (1376 см^{-1} и 1542 см^{-1}), соответственно, имея отношение $I_D / I_G = 0.97$. Сходные значения отношения I_D / I_G для ОГ и ГФМ указывают на то, что функционализация ОГ с помощью L-метионина не влияет на атомы углерода на поверхности графена и включает только поверхностные карбоксильные группы. Анализ Рис. 11 также показывает, что 2D-полосы могут наблюдаться как для ОГ, так и для ГФМ. Отношение $I_{2D} / I_G = 0,65$ одинаково для ОГ и ГФМ, что свидетельствует о многослойной структуре обоих материалов.

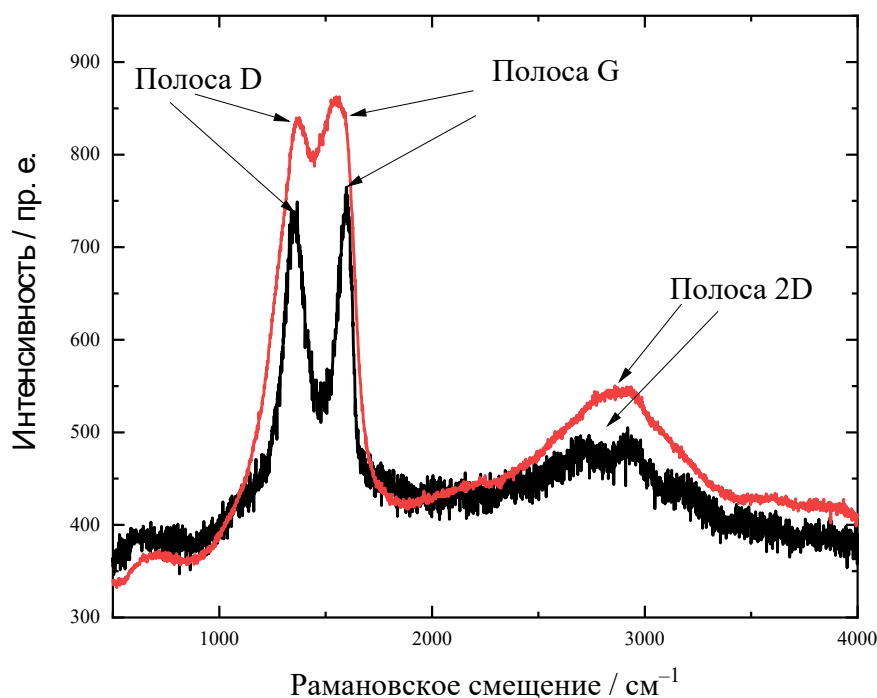
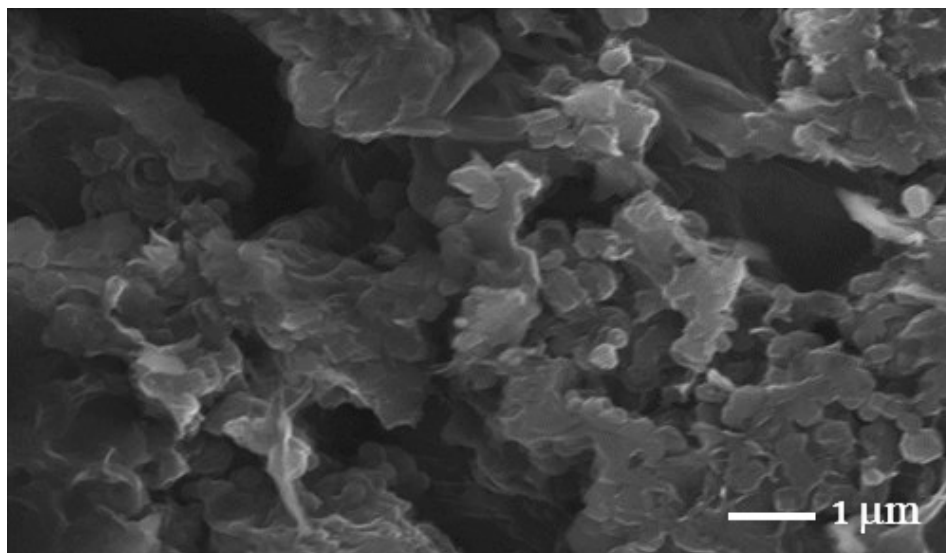


Рис. 11. Рамановские спектры ОГ (—) и ГФМ (—).

3.1.6. СЭМ и ВРЭМ

На Рис. 12, 13 показаны изображения СЭМ и ВРЭМ для ОГ (а) и ГФМ (б). Структура обоих материалов представляет собой однородные поверхности, состоящие из слоёв графена. В случае ГФМ его структура более однородна, а расстояние между слоями больше из-за функционализации. Видно, что поверхность ОГ состоит из множества слоёв с острыми краями. ГФМ имеет складчатую поверхность и более упорядоченную, чем ОГ, с большим количеством отдельных слоёв. Таким образом, с точки зрения морфологии поверхности ГФМ его структура имеет меньшее количество краёв и, как следствие, более высокую биосовместимость по сравнению с ОГ.

(a)



(б)

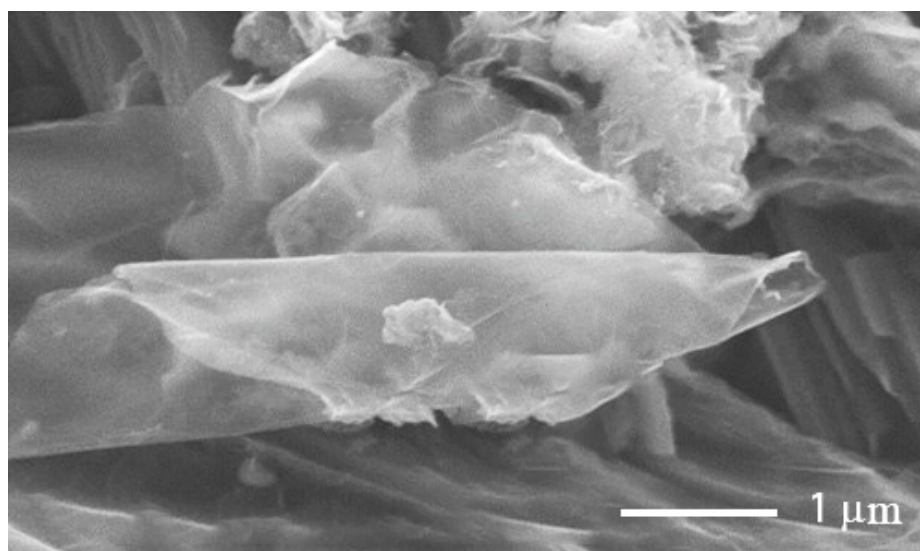
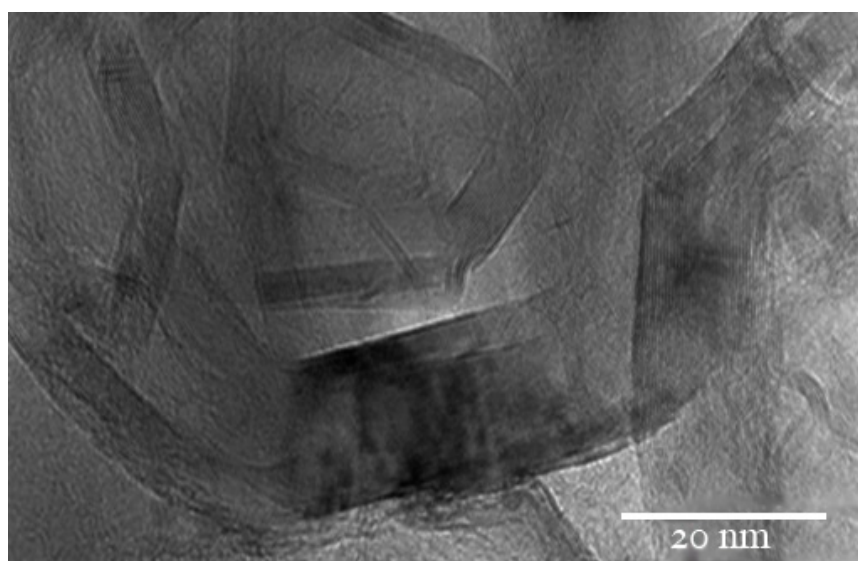


Рис. 12. Изображения СЭМ для ОГ (a) и ГФМ (б).

(a)



(б)

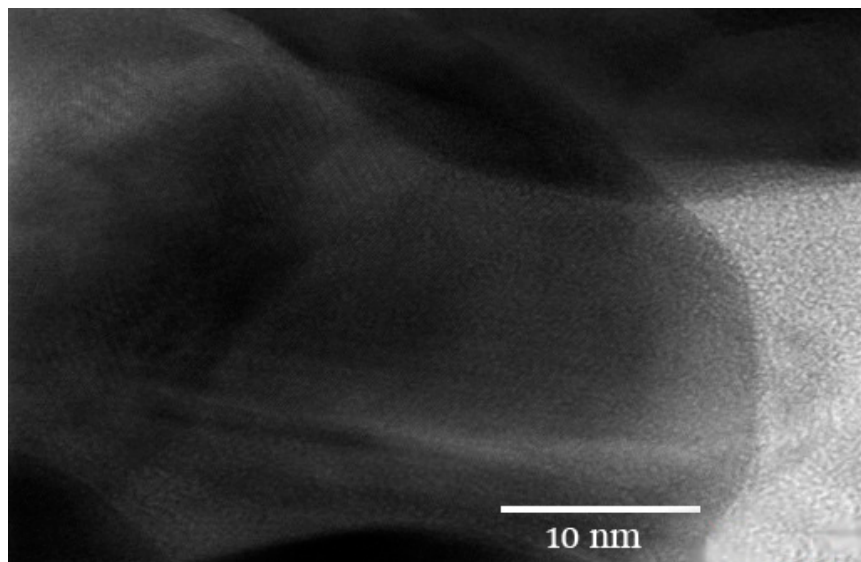
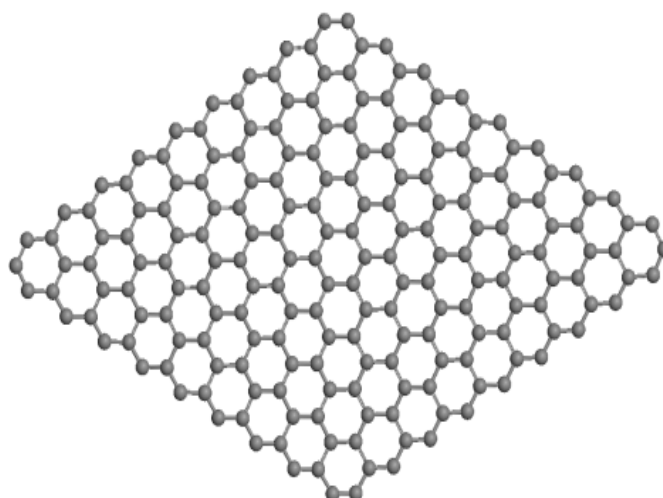


Рис. 13. Изображения ВРЭМ для ОГ (а) и ГФМ (б).

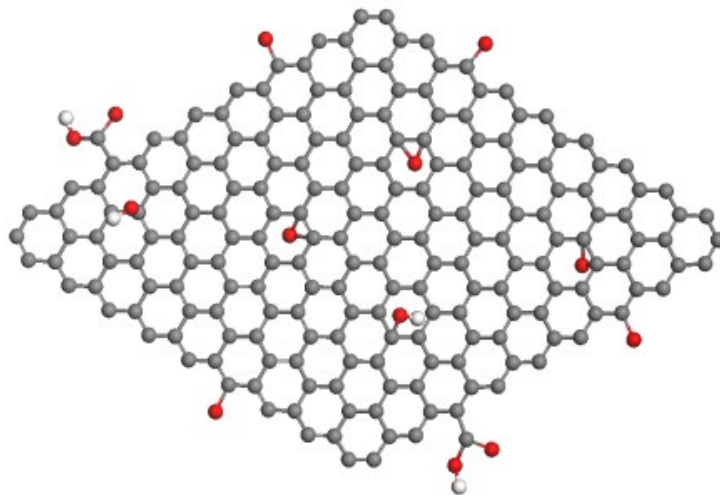
3.2. Компьютерное моделирование

Сравнительный анализ взаимодействий ОГ и ГФМ с водой был выполнен с использованием DFT и классической МД. Смоделированная наночастица графена состояла из 196 атомов углерода (Рис. 14а). Выбранная структура ОГ имела минимальное взаимное влияние кислорода и кислородсодержащих групп (Рис. 14б); атомы углерода были модифицированы карбонильной, гидроксильной, карбоксильной и эпоксидной группами. При этом карбонильные и карбоксильные группы располагались по границам наночастицы, а гидроксильные и эпоксидные группы располагались на плоскости. На Рис. 14в представлена структура ГФМ, в которой остатки L-метионина присоединены к поверхности графена за счёт амидных связей.

(а)



(б)



(в)

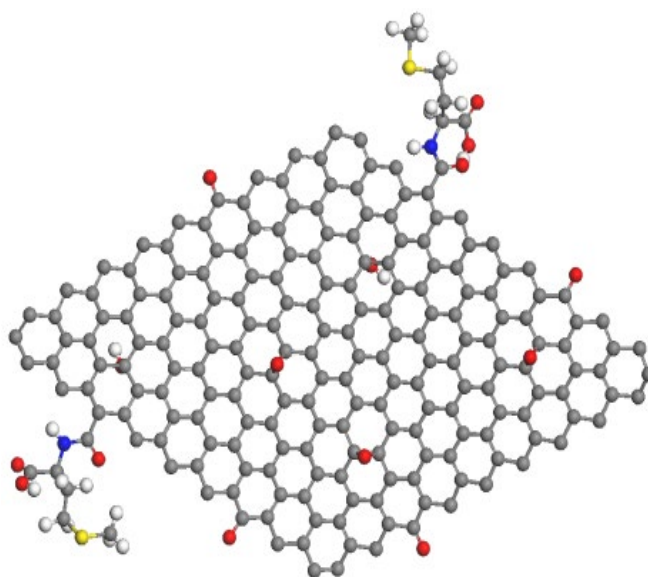


Рис. 14. Смоделированные наночастицы графена (а), ОГ (б) и ГФМ (в).

В результате моделирования МД были получены функции радиального распределения (RDF) молекул воды относительно модифицированных и немодифицированных атомов углерода графена (Рис. 15 и Табл. 3). Можно отметить, что в случае ОГ и ГФМ молекулы воды наиболее близко подходят ко всем атомам углерода по сравнению с чистым графеном. Анализ максимумов RDF показывает, что молекулы воды расположены ближе к атому углерода графенового листа ($3,51 \text{ \AA}$), чем к атому углерода амидной связи ($4,37 \text{ \AA}$, Рис. 14в). Это вызвано экранирующим эффектом атома азота и, как следствие, блокировкой доступа молекулам воды. Таким образом, наночастица ГФМ имеет лучшую гидрофильность по сравнению как с графеном, так и с ОГ.

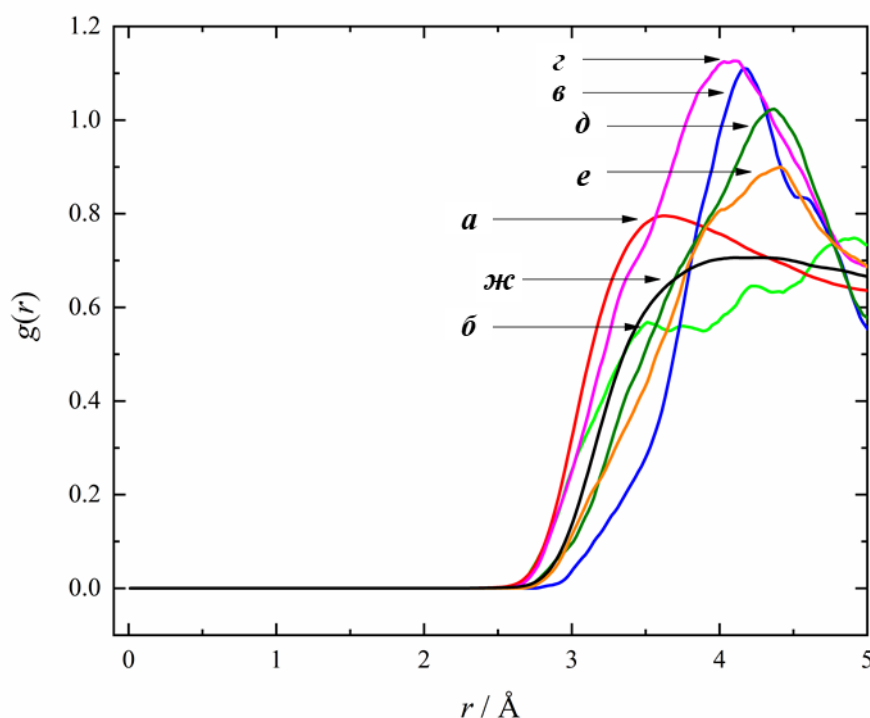


Рис. 15. RDF различных типов атомов углерода в молекуле ГФМ: (а) С-Плоскость (немодифицированные атомы углерода графена в молекуле ГФМ), (б) С-Карбоксил (атом углерода графена, связанный с атомом углерода карбоксильной группы L-метионина), (в) С-Гидроксид (атом углерода графена, модифицированный гидроксильной группой), (г) С-Карбонил (атом углерода графена, соединённый с атомом кислорода двойной связью), (д) С-Карбокси (углерод атом карбоксильной группы аминокислоты, связанный с атомом углерода графена), (е) С-Эпоксид (атомы углерода графена в эпоксидной группе); (жс) немодифицированный графен.

Таблица 3. Максимальные значения RDF (Å).

	С- Плоскость	С- Карбокси	С- Эпоксид	С- Карбоксил	С- Гидроксид	С- Карбонил
ОГ	3,63	3,97	4,27	5,11	3,91	3,99
ГФМ	3,63	4,37	4,41	3,51	4,17	4,11
Графен	3,99	—	—	—	—	—

3.3. Распределение по размерам и ζ -потенциалы наночастиц ГФМ

В Табл. 4 представлены полученные данные по распределению по размерам и ζ -потенциалам водных дисперсий ГФМ. Видно, что в диапазоне концентраций $C = 2.5$ –

25 мг·л⁻¹ гидродинамический диаметр наночастиц ГФМ увеличивается от 500 до 960 нм. Этот факт может быть связан в основном с образованием ассоциатов из-за образования водородных связей и гидрофобных взаимодействий между наночастицами ГФМ. Анализ концентрационной зависимости ζ -потенциалов показывает, что во всём исследованном диапазоне концентраций водные дисперсии ГФМ электрокинетически стабильны.

Таблица 4. Гидродинамические диаметры и ζ -потенциалы наночастиц ГФМ в водной дисперсии при $T = 298,15$ К.

$C / \text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$	$\delta / \text{нм}$	$\zeta / \text{мВ}$
2,5	500	-30
6,25	650	-30
12,5	700	-35
18,75	770	-40
25	960	-40

3.4. Изучение биосовместимости

3.4.1. Гемолитическая активность

Для оценки биосовместимости ГФМ изучено его влияние на спонтанный гемолиз эритроцитов. В случае совместимых с кровью веществ мембрана эритроцитов остаётся неповреждённой и содержимое клетки не выделяется. В данном случае токсичность ГФМ определялась путём оценки высвобожденного гемоглобина. На Рис. 16 видно, что ГФМ обладает хорошей гемосовместимостью, а значения скорости гемолиза суспензий эритроцитов, содержащих ГФМ, очень близки к контрольному образцу. Последний факт свидетельствует о том, что ГФМ не вызывает разрушения мембраны эритроцитов. Liao с соавт. [58] исследовал гемолитическую активность ОГ различного размера и содержания функциональных групп, и определил, что мембрана эритроцитов повреждается дозозависимым образом, что приводит к высвобождению гемоглобина. Концентрации ОГ, приводящие к 50 % лизису эритроцитов (TC_{50}), находятся в интервале $C = 20,2\text{--}49,6$ мг·л⁻¹ в зависимости от условий синтеза. Сравнение литературных данных с результатами, полученными для ГФМ при максимальной концентрации ($C = 25$ мг·л⁻¹), показало, что скорость гемолиза варьируется от 20 до 70 %. Таким образом, функционализация поверхности ОГ

приводит к увеличению гемосовместимости [58–60]. Этот факт связан со сложными структурными различиями между ОГ и модифицированным ОГ, включая поверхностный заряд, образование активных форм кислорода (АФК) и отсутствие чрезвычайно острых краёв на границах графеновых слоёв [61].

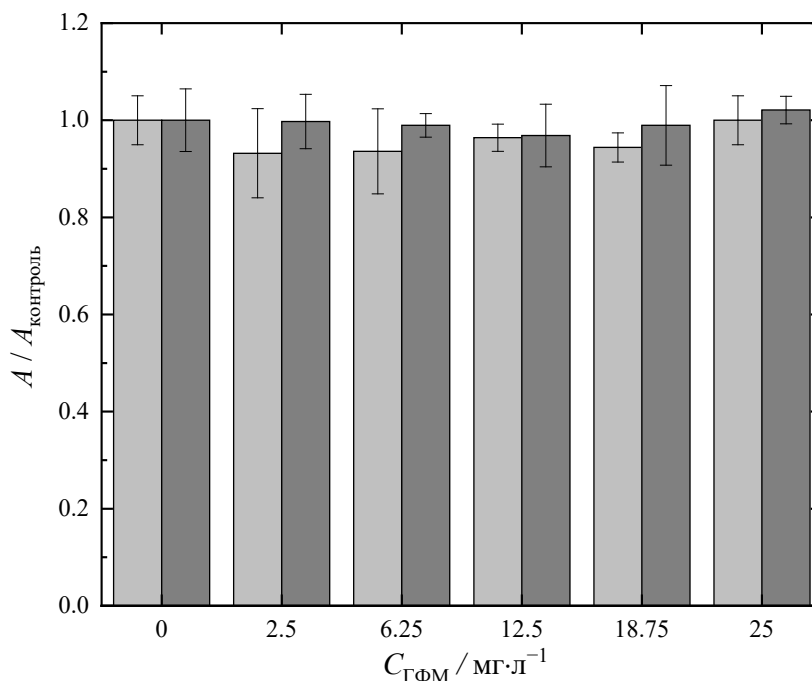


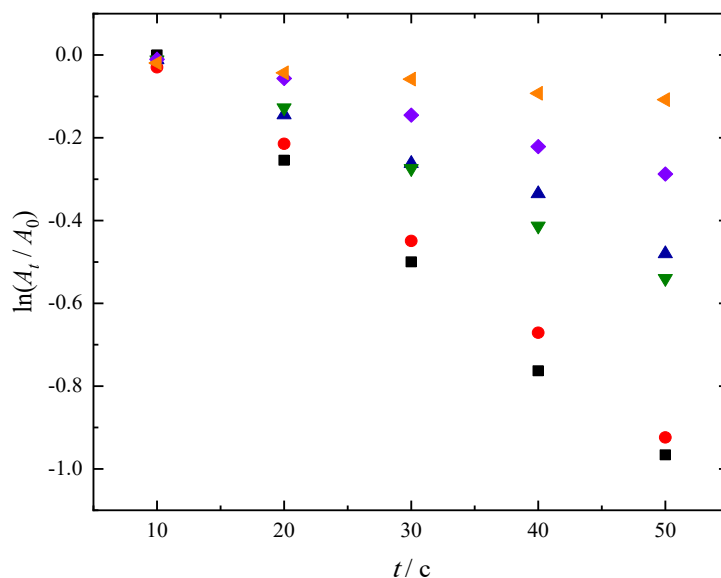
Рис. 16. Зависимость нормализованной оптической плотности супернатанта от концентрации ГФМ после 1 ч (светло-серый цвет) и 3 ч (тёмно-серый цвет) инкубации, где $A / A_{\text{контроль}}$ представляет собой соотношение оптической плотности образцов и эталона.

3.4.2. Фотовыцветание

Деградацию фотосенсибилизатора оценивали путём измерения константы скорости фотодеградации (k_{deg}), значение которой можно определить как наклон кинетических кривых в координатах $\ln(A_t / A_0) - t$. Уменьшение k_{deg} указывает на наличие у исследуемого соединения свойств тушителя синглетного кислорода. В свою очередь, увеличение k_{deg} может свидетельствовать о том, что соединение обладает свойствами индуктора синглетного кислорода. В данном случае азид натрия ($C = 32,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), который является сильным антиоксидантом, был использован в качестве контрольного соединения. Измерения спектров поглощения Радахлорина проводились в отсутствие и в присутствии ОГ и ГФМ при четырёх различных концентрациях ($C =$

2,5, 12,5, 18,75 и 25 мг·л⁻¹) и азида натрия. По спектрам поглощения были построены зависимости $\ln(A_t / A_0)$ от времени облучения (в секундах). Полученные данные представлены на Рис. 17 и в Табл. 5. Из полученных результатов видно, что добавление ОГ и ГФМ к Радахлорину приводит к уменьшению k_{deg} . Можно сделать вывод, что ОГ и ГФМ проявляют практически одинаковые антиоксидантные свойства при облучении, которые возрастают с увеличением концентрации.

(a)



(б)

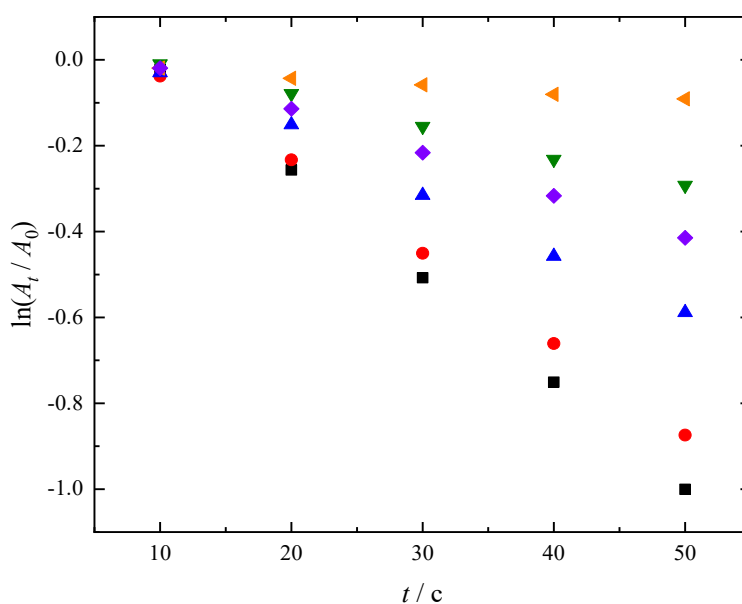


Рис. 17. Зависимость фотовыцветания Радахлорина (■) от значения $\ln(A_t / A_0)$ в присутствии (а) ГФМ, (б) ОГ (● 2.5, ▲ 12.5, ▼ 18.75, ◆ 25 мг·л⁻¹) и NaN₃ (◀ 500 μМ) от дозы лазерного облучения (653 нм, выходная мощность — 9 мВ). A_0 и A_t — оптические плотности раствора Радахлорина при 659 нм до и после облучения, соответственно.

Таблица 5. Значения констант фотовыцветания Радахлорина в присутствии NaN₃ и ГФМ.

Соединение	$C / \text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$	$k_{\text{deg}} / \text{с}^{-1}$
—	—	$0,024 \pm 0,002$
NaN ₃	32,5	$0,0023 \pm 0,0001$
ГФМ	2,5	$0,022 \pm 0,002$
ГФМ	12,5	$0,013 \pm 0,003$
ГФМ	18,75	$0,011 \pm 0,002$
ГФМ	25,0	$0,0072 \pm 0,0002$
ОГ	2,5	$0,021 \pm 0,004$
ОГ	12,5	$0,014 \pm 0,006$
ОГ	18,75	$0,010 \pm 0,001$
ОГ	25,0	$0,0074 \pm 0,0003$

3.4.3. Антирадикальная активность

Из Рис. 18 можно сделать вывод, что антирадикальная активность ГФМ увеличивается с увеличением концентрации ($C = 0.25\text{--}25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Для определения значений IC_{50} (концентрация образца, необходимая для достижения 50 % ингибирования радикала ДФПГ) были выполнены статистические расчёты, и значение IC_{50} было равно $11.33 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Для сравнения [48,62] IC_{50} аскорбиновой кислоты равно $4.53 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Антирадикальная активность ГФМ может быть объяснена (i) высокой электронной плотностью на поверхности ГФМ, которая может участвовать в улавливании свободных радикалов ДФПГ, и (ii) возможностью водородсодержащих функциональных групп восстанавливать ДФПГ до нерадикальной формы (предполагаемый механизм антирадикальной активности ГФМ представлен на Рис. 19). Для сравнения можно привести публикацию [45], посвящённую изучению антирадикальной активности дисперсии ОГ ($C = 100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Оказалось, что ОГ

проявляет слабую активность (в 2,5 раза меньше) по отношению к ДФПГ по сравнению с аскорбиновой кислотой. В то же время ОГ проявляет значительную поглощающую способность по отношению к гидроксильному и супероксидному радикалам и может защищать различные биомолекулы от окисления [45].

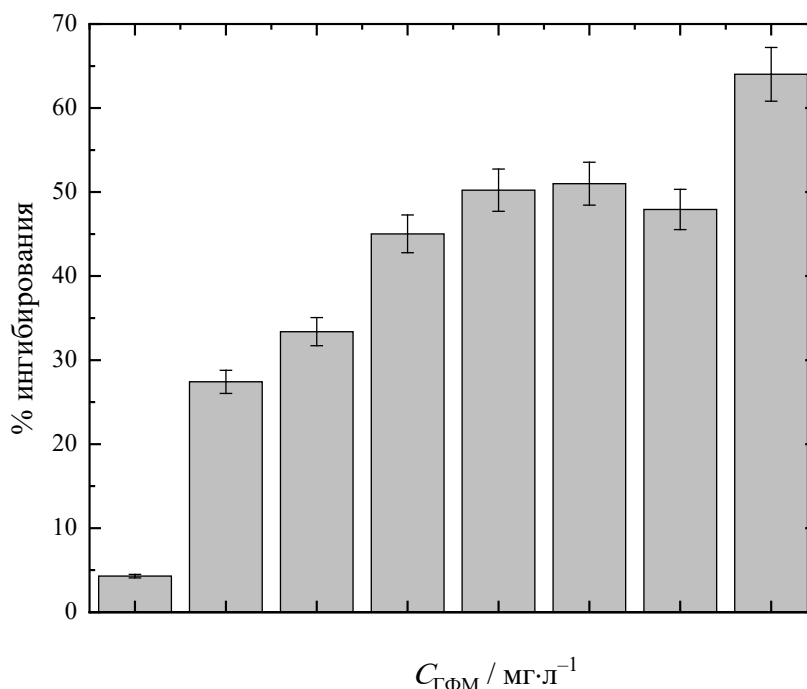


Рис. 18. Зависимость фракции восстановленного радикала (% ингибирования) от концентрации ГФМ ($C_{\text{ГФМ}}$) ($SD = 5\%$).

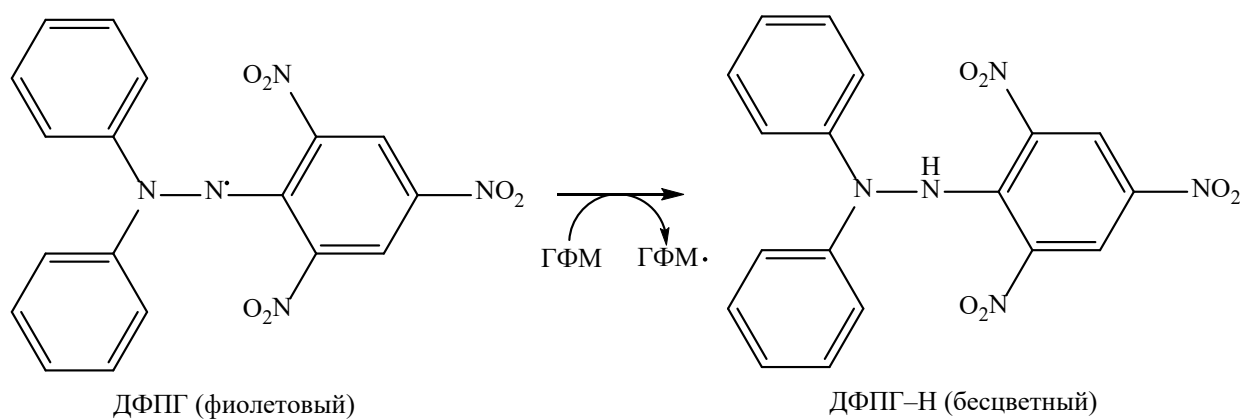


Рис. 19. Предполагаемый механизм взаимодействия ГФМ и ДФПГ.

3.4.4. Агрегация тромбоцитов

В Табл. 6 показаны результаты влияния ГФМ на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Степень агрегации оценивали по амплитуде, которая представляет максимальное приращение светопропускания после добавления

индуктора. Из Табл. 6 очевидно, что с увеличением концентрации ГФМ агрегационная активность снижается. Таким образом, ГФМ обладает антиагрегантной активностью в тестах на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ. Singh с соавт. [60,63] продемонстрировал, что добавление ОГ к суспензии свежевыделенных тромбоцитов человека ($0,5\text{--}0,8 \cdot 10^9$ клеток на мл) индуцировало агрегацию тромбоцитов дозозависимым образом. Даже при концентрации $2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ агрегация, вызванная ОГ, была сильнее, чем агрегация, вызванная тромбином ($1 \text{ МЕ} \cdot \text{мл}^{-1}$).

Таблица 6. Влияние ГФМ на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в PRP.

Амплитуда / %					
$C_{\text{ГФМ}} / \text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$					
Контроль	2,5	6,25	12,5	18,75	25
$79,5 \pm 4,77$	$70,2 \pm 4,14$	$69,7 \pm 4,88$	$58,9 \pm 4,12$	$54,3 \pm 4,34$	$52,6 \pm 4,21$

3.4.5. Связывание с ЧСА

Для определения константы связывания (K_b) ГФМ с ЧСА по данным флуоресцентной спектроскопии было использовано уравнение Скэтчарда:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_b + n \lg Q \quad (2),$$

где F_0 и F — интенсивность флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя (ГФМ), K_b — константа связывания, n — число сайтов связывания, Q — концентрация тушителя.

Данные полученные из зависимости $\lg[(F_0 - F) / F]$ от $\lg Q$ представлены в Табл. 7, откуда видно, что значения K_b для комплексов ГФМ с ЧСА находятся за пределами эффективного диапазона $10^5\text{--}10^4 \text{ М}^{-1}$, необходимого ЧСА для выполнения транспортных функций в кровотоке. Малые значения K_b указывают на то, что ГФМ образует нестабильные комплексы с ЧСА. Анализ Табл. 7 показывает, что с повышением температуры можно наблюдать снижение связывающей способности ЧСА к ГФМ. Например, при $T = 298,15 \text{ К}$ ЧСА взаимодействует с ГФМ в стехиометрическом соотношении 1:1, тогда как при $T = 318,15 \text{ К}$ стехиометрическое соотношение составляет 0,63:1 (примерно две молекулы ЧСА на одну наночастицу ГФМ).

Авторы работы [64] представили экспериментальные данные по связыванию ОГ с ЧСА. Из значений константы диссоциации K_d (обратной константе связывания) комплекса ЧСА с ОГ ($K_d = 27,5 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) и комплекса ЧСА с ГФМ ($K_d = 185,2 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) следует, что сродство связывания для ГФМ меньше, чем для ОГ. Это связано с тем, что связывание ОГ с ЧСА основано на образовании ковалентных связей за счёт взаимодействия эпоксидных групп ОГ и свободных аминок групп Lys и Arg ЧСА по механизму нуклеофильного присоединения, а также водородных связей. В свою очередь, взаимодействие модифицированного ОГ с ЧСА в основном происходит за счёт образования водородных связей, так как эпоксидные группы блокируются карбоксильными. [64].

Таблица 7. Значения констант связывания ГФМ с ЧСА (K_b) и число сайтов связывания (n).

T / K	$K_b / \text{л} \cdot \text{г}^{-1}$	n
298,15	5,40	0,92
303,15	2,52	0,71
308,15	2,88	0,77
313,15	2,01	0,64
318,15	1,85	0,63

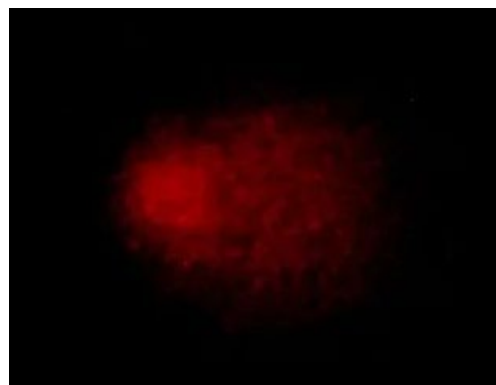
3.4.6. Генотоксичность

Средние значения % хвостовой ДНК, длины хвоста и момента хвоста комет, наблюдаемых в случае РВМС человека, инкубированных в присутствии H_2O_2 (положительный контроль), фосфатно-солевого буферного раствора Дульбекко (DBPS, отрицательный контроль) и ГФМ, представлены в Табл. 8. Степень повреждения ДНК человека РВМС в присутствии H_2O_2 значительно больше, чем у контрольных клеток. В качестве примера на Рис. 20 представлены фотографии ДНК-комет в присутствии H_2O_2 ($C = 3,4 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$, положительный контроль), DPBS (отрицательный контроль) и ГФМ ($C = 6,25\text{--}25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$).

(a)



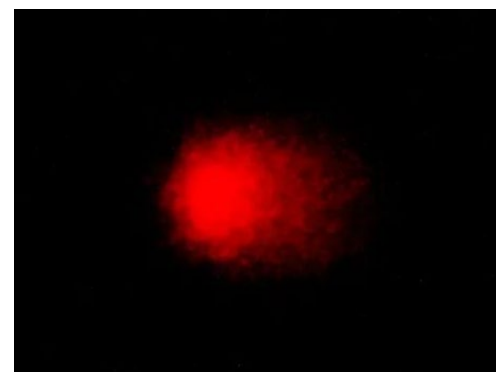
(б)



(в)



(г)



(д)

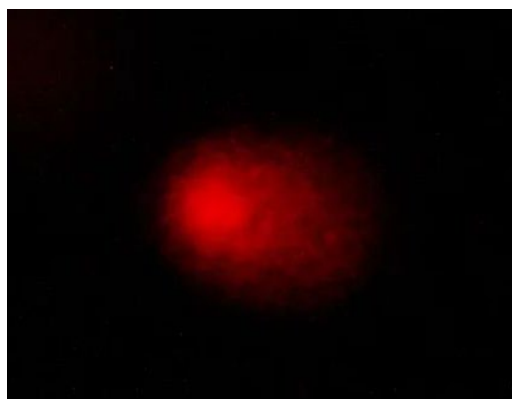


Рис. 20. Фотографии ДНК комет после электрофореза клеток в микрогеле. (a) — отрицательный контроль (DPBS), (б) — положительный контроль (H_2O_2 , $C = 3,4$ $\text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$), (в, г, д) — ГФМ ($C = 6,25, 12,5$ и 25 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$).

Таблица 8. Влияние ГФМ на % хвостовой ДНК, длину и момент хвоста комет РВМС человека.

Изучаемая характеристика	Отрицательный контроль	Амплитуда / %			
		$C_{H_2O_2} / \text{мкг} \cdot \text{л}^{-1}$		$C_{\text{ГФМ}} / \text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$	
		3,4	6,25	12,5	25
% хвостовой ДНК	$3,60 \pm 0,85$	$85,12 \pm 5,11$	$4,30 \pm 1,88$	$8,32 \pm 2,87$	$17,56 \pm 4,20$
Длина хвоста	$12,10 \pm 2,60$	$662,44 \pm 72,87$	$27,64 \pm 5,20$	$46,21 \pm 6,83$	$92,18 \pm 12,73$
Хвостовой момент	$0,44 \pm 0,02$	$563,87 \pm 3,72$	$1,19 \pm 0,10$	$3,84 \pm 0,20$	$16,19 \pm 0,53$

Из полученных результатов можно видеть, что ГФМ при наивысшей рассматриваемой концентрации показал большую разницу в % хвостовой ДНК, длине хвоста и моменте хвоста по сравнению с отрицательным контролем. Данные результаты показывают, что с увеличением концентрации генотоксичность ГФМ возрастает. Bengtson с соавт. [65] провёл эксперименты по генотоксичности с использованием метода ДНК-комет. Сообщалось, что многослойный ОГ с размером частиц более 1 мкм не является генотоксичным по отношению к эпителиальным клеткам лёгких мышей FE1 при концентрациях до $200 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ после 3 и 24 ч воздействия. В другом исследовании Hashemi и соавт. [66] оценили генотоксичность ОГ в сперматогониальных стволовых клетках ($C = 0,1\text{--}400 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Авторы сообщили, что высокие концентрации ОГ значительно увеличивают повреждение ДНК, что приводит к значительной токсичности; при более низких концентрациях значимого генотоксического эффекта не наблюдалось.

3.4.7. Цитотоксичность

Установлено, что культивирование клеток НЕК293 с ГФМ в диапазоне концентраций $C = 2,5\text{--}25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ не вызывает токсического эффекта (Рис. 21). Была выявлена хорошая выживаемость клеток при концентрациях до $C = 25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Влияние ОГ ($C = 0\text{--}50 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) на жизнеспособность клеток НЕК293 была определена в работе Gurunathan и соавт. через 24 ч воздействия с использованием анализа ССК-8 [67]. Было установлено, что ОГ со средним размером частиц 50 нм вызывает значительный и дозозависимый токсический эффект даже при концентрации $C = 10 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$.

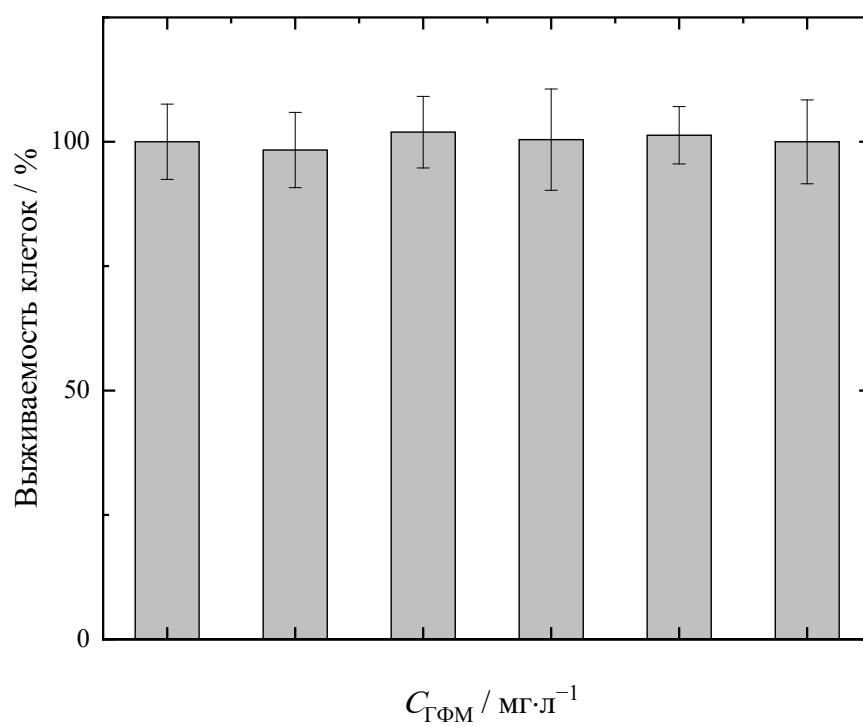


Рис. 21. Зависимость относительного количества выживших клеток (%) от концентрации ГФМ ($C_{\text{ГФМ}}$).

Основные результаты и выводы

1. Впервые проведён синтез ОГ с высоким содержанием кислородсодержащих функциональных групп (85 %), включающих гидроксильные, эпоксидные, карбоксильные и карбонильные группы, что на десять процентов выше по сравнению с литературными данными.
2. Впервые проведена ковалентная функционализация ОГ L-метионином. Загрузка аминокислоты составила 3 %.
3. Была проведена характеристика ОГ и ГФМ с использованием комплекса физико-химических методов (рентгеноструктурный анализ, ИК-спектроскопия, термогравиметрический анализ, РФЭС, Рамановская спектроскопия, СЭМ и ВРЭМ, а также распределение частиц ГФМ по размерам и ζ -потенциалы).
4. Было проведено комплексное изучение биологических свойств ГФМ. Показано, что функционализация ОГ L-метионином приводит к увеличению биосовместимости, в частности гемосовместимости и уменьшению цитотоксичности.

Благодарности

Идентификация производного ОГ с L-метионином были проведены с использованием оборудования ресурсных центров «Методы анализа состава вещества», «Магнитно-резонансные методы исследования», «Инновационные технологии композитных наноматериалов», Междисциплинарный ресурсный центр по направлению «Нанотехнологии», «Термогравиметрические и калориметрические методы исследования», «Рентгенодифракционные методы исследования», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники», «Вычислительный центр СПбГУ» Научного парка СПбГУ.

Список цитированной литературы

1. Lee C. et al. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene // Science. American Association for the Advancement of Science, 2008. Vol. 321, № 5887. P. 385–388.
2. Kuilla T. et al. Recent advances in graphene based polymer composites // Prog. Polym. Sci. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 35, № 11. P. 1350–1375.
3. Pendolino F., Armata N. Graphene oxide in environmental remediation process. Cham: Springer International Publishing, 2017.
4. Pei S., Cheng H.M. The reduction of graphene oxide // Carbon N. Y. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 50, № 9. P. 3210–3228.
5. Smith A.T. et al. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites // Nano Mater. Sci. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 1, № 1. P. 31–47.
6. Brodie B.C. XIII. On the atomic weight of graphite // Philos. Trans. R. Soc. London. 1859. Vol. 149, № 1859. P. 249–259.
7. Staudenmaier L. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure // Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft. 1898. Vol. 31, № 2. P. 1481–1487.
8. Hummers W.S., Offeman R.E. Preparation of graphitic oxide // J. Am. Chem. Soc. 1958. Vol. 80, № 6. P. 1339.
9. Choi E.Y. et al. Noncovalent functionalization of graphene with end-functional polymers // J. Mater. Chem. 2010. Vol. 20, № 10. P. 1907–1912.
10. Georgakilas V. et al. Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications // Chemical Reviews. 2012. Vol. 112, № 11. P. 6156–6214.
11. Li D. et al. When biomolecules meet graphene: From molecular level interactions to material design and applications // Nanoscale. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 8, № 47. P. 19491–19509.
12. Zhou W. et al. Surface functionalization of graphene oxide by amino acids for *Thermomyces lanuginosus* lipase adsorption // J. Colloid Interface Sci. Academic Press Inc., 2019. Vol. 546. P. 211–220.
13. Rambabu G., Bhat S.D. Amino acid functionalized graphene oxide based nanocomposite membrane electrolytes for direct methanol fuel cells // J. Memb. Sci.

Elsevier B.V., 2018. Vol. 551. P. 1–11.

14. Marcano D.C. et al. Improved synthesis of graphene oxide // ACS Nano. American Chemical Society, 2010. Vol. 4, № 8. P. 4806–4814.
15. Qiao Y. et al. L-Cysteine tailored porous graphene aerogel for enhanced power generation in microbial fuel cells // RSC Adv. Royal Society of Chemistry (RSC), 2015. Vol. 5, № 72. P. 58921–58927.
16. Muralikrishna S. et al. In situ reduction and functionalization of graphene oxide with L-cysteine for simultaneous electrochemical determination of cadmium(II), lead(II), copper(II), and mercury(II) ions // Anal. Methods. Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 6, № 21. P. 8698–8705.
17. Liu Z. et al. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs // J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society, 2008. Vol. 130, № 33. P. 10876–10877.
18. Jiang H. Chemical preparation of graphene-based nanomaterials and their applications in chemical and biological sensors // Small. John Wiley & Sons, Ltd, 2011. Vol. 7, № 17. P. n/a-n/a.
19. Guo S., Dong S. Graphene nanosheet: Synthesis, molecular engineering, thin film, hybrids, and energy and analytical applications // Chem. Soc. Rev. The Royal Society of Chemistry, 2011. Vol. 40, № 5. P. 2644–2672.
20. Li N. et al. Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells // Sci. Rep. 2013. Vol. 3. P. 1604.
21. Kim Y.K., Kim M.H., Min D.H. Biocompatible reduced graphene oxide prepared by using dextran as a multifunctional reducing agent // Chem. Commun. The Royal Society of Chemistry, 2011. Vol. 47, № 11. P. 3195–3197.
22. Lingaraju K. et al. Biocompatible synthesis of reduced graphene oxide from *Euphorbia heterophylla* (L.) and their in-vitro cytotoxicity against human cancer cell lines // Biotechnol. Reports. Elsevier B.V., 2019. Vol. 24. P. e00376.
23. Marimuthu M. et al. Hybridized graphene nanomaterials for drug delivery, cytocompatibility, and electrochemical biosensor application // Fullerenes, Graphenes and Nanotubes: A Pharmaceutical Approach. Elsevier, 2018. P. 375–411.
24. Foo M.E., Gopinath S.C.B. Feasibility of graphene in biomedical applications // Biomedicine and Pharmacotherapy. Elsevier Masson SAS, 2017. Vol. 94. P. 354–361.

25. Song S. et al. Biomedical application of graphene: From drug delivery, tumor therapy, to theranostics // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. Elsevier, 2020. Vol. 185, № July 2019. P. 110596.
26. Lin J., Chen X., Huang P. Graphene-based nanomaterials for bioimaging // *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 2016. Vol. 105. P. 242–254.
27. Yogesh G.K. et al. Synthesis, characterization and bioimaging application of laser-ablated graphene-oxide nanoparticles (nGOs) // *Diam. Relat. Mater.* Elsevier Ltd, 2020. Vol. 104. P. 107733.
28. Geetha Bai R. et al. Graphene: A versatile platform for nanotheranostics and tissue engineering // *Progress in Materials Science*. Elsevier Ltd, 2018. Vol. 91. P. 24–69.
29. Krishnamoorthy K. et al. Antibacterial activity of graphene oxide nanosheets // *Sci. Adv. Mater.* 2012. Vol. 4, № 11. P. 1111–1117.
30. Sawangphruk M. et al. Synthesis and antifungal activity of reduced graphene oxide nanosheets // *Carbon N. Y.* 2012. Vol. 50, № 14. P. 5156–5161.
31. Ye S. et al. Antiviral activity of graphene oxide: How sharp edged structure and charge matter // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. American Chemical Society, 2015. Vol. 7, № 38. P. 21578–21579.
32. Liu J., Cui L., Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications // *Acta Biomaterialia*. Elsevier, 2013. Vol. 9, № 12. P. 9243–9257.
33. Malik N., Arfin T., Khan A.U. Graphene nanomaterials: chemistry and pharmaceutical perspectives // *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*. Elsevier, 2019. P. 373–402.
34. Lerra L. et al. Graphene oxide functional nanohybrids with magnetic nanoparticles for improved vectorization of doxorubicin to neuroblastoma cells // *Pharmaceutics*. MDPI AG, 2019. Vol. 11, № 1.
35. He L. et al. Label-free femtomolar cancer biomarker detection in human serum using graphene-coated surface plasmon resonance chips // *Biosens. Bioelectron.* Elsevier Ltd, 2017. Vol. 89. P. 606–611.
36. Zaidi S.A., Shahzad F., Batool S. Progress in cancer biomarkers monitoring strategies using graphene modified support materials // *Talanta*. Elsevier B.V., 2020. Vol. 210. P. 120669.
37. Fiorillo M. et al. Graphene oxide selectively targets cancer stem cells, across multiple

- tumor types: Implications for non-toxic cancer treatment, via “differentiation-based nano-therapy” // *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 2015. Vol. 6, № 6. P. 3553–3562.
38. Roberts A., Tripathi P.P., Gandhi S. Graphene nanosheets as an electric mediator for ultrafast sensing of urokinase plasminogen activator receptor-A biomarker of cancer // *Biosens. Bioelectron.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 141. P. 111398.
 39. Saeed A.A. et al. DNA biosensors based on gold nanoparticles-modified graphene oxide for the detection of breast cancer biomarkers for early diagnosis // *Bioelectrochemistry*. Elsevier B.V., 2017. Vol. 118. P. 91–99.
 40. Govindasamy M. et al. A novel electrochemical sensor for determination of DNA damage biomarker (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in urine using sonochemically derived graphene oxide sheets covered zinc oxide flower modified electrode // *Ultrason. Sonochem.* Elsevier B.V., 2019. Vol. 58. P. 104622.
 41. Xu M. et al. Improved *in vitro* and *in vivo* biocompatibility of graphene oxide through surface modification: Poly(acrylic acid)-functionalization is superior to PEGylation // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2016. Vol. 10, № 3. P. 3267–3281.
 42. Yan X. et al. Fabrication of free-standing, electrochemically active, and biocompatible graphene oxide-polyaniline and graphene-polyaniline hybrid papers // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. American Chemical Society, 2010. Vol. 2, № 9. P. 2521–2529.
 43. Cai B. et al. Bovine serum albumin bioconjugated graphene oxide: Red blood cell adhesion and hemolysis studied by QCM-D // *Appl. Surf. Sci.* 2015. Vol. 356. P. 844–851.
 44. Geng H. et al. Antibacterial ability, cytocompatibility and hemocompatibility of fluorinated graphene // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. Elsevier B.V., 2019. Vol. 173. P. 681–688.
 45. Qiu Y. et al. Antioxidant chemistry of graphene-based materials and its role in oxidation protection technology // *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 6, № 20. P. 11744–11755.
 46. Hadjur C. et al. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* Elsevier, 1998. Vol. 45, № 2–3. P. 170–178.
 47. Galebskaya L. V. et al. The importance of a photosensitizer bleaching registration for

- the evaluation of mechanism of preparation action on the photo-induced hemolysis // Biomed. Photonics. Russian Photodynamic Association, 2017. Vol. 6, № 3. P. 33–38.
48. Al-Ani L.A. et al. Hybrid nanocomposite curcumin-capped gold nanoparticle-reduced graphene oxide: Anti-oxidant potency and selective cancer cytotoxicity // PLoS One. 2019. Vol. 14, № 5. P. 1–24.
49. Podolsky N.E. et al. Physico-chemical properties of $C_{60}(OH)_{22-24}$ water solutions: Density, viscosity, refraction index, isobaric heat capacity and antioxidant activity // J. Mol. Liq. 2019. Vol. 278. P. 342–355.
50. Pochkaeva E.I. et al. Polythermal density and viscosity, nanoparticle size distribution, binding with human serum albumin and radical scavenging activity of the C_{60} -L-arginine ($C_{60}(C_6H_{13}N_4O_2)_8H_8$) aqueous solutions // J. Mol. Liq. Elsevier B.V., 2020. Vol. 297. P. 111915.
51. Gaponenko I.N. et al. Biological evaluation and molecular dynamics simulation of water-soluble fullerene derivative $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ // Toxicol. Vitr. Elsevier Ltd, 2020. Vol. 62. P. 104683.
52. Olive P.L., Banáth J.P., Durand R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay // Radiat. Res. 1990. Vol. 122, № 1. P. 86–94.
53. Semenov K.N. et al. Physico-chemical and biological properties of C_{60} -L-hydroxyproline water solutions // RSC Adv. The Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 7, № 25. P. 15189–15200.
54. An J. et al. Synthesis of a biocompatible gelatin functionalized graphene nanosheets and its application for drug delivery // Mater. Sci. Eng. C. 2013. Vol. 33, № 5. P. 2827–2837.
55. Awwad A.M., Salem N.M., Abdeen A.O. Novel approach for synthesis sulfur (S-NPs) nanoparticles using *Albizia julibrissin* fruits extract // Adv. Mater. Lett. VBRI Press, 2015. Vol. 6, № 5. P. 432–435.
56. Seol Y.G. et al. Nanocomposites of reduced graphene oxide nanosheets and conducting polymer for stretchable transparent conducting electrodes // J. Mater. Chem. 2012. Vol. 22, № 45. P. 23759–23766.
57. Croitoru A. et al. Multifunctional platforms based on graphene oxide and natural products // Medicina (B. Aires). 2019. Vol. 55, № 6. P. 230.

58. Liao K.H. et al. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts // ACS Appl. Mater. Interfaces. American Chemical Society, 2011. Vol. 3, № 7. P. 2607–2615.
59. Guo M. et al. N-containing functional groups induced superior cytocompatible and hemocompatible graphene by NH₂ ion implantation // J. Mater. Sci. Mater. Med. Springer, 2013. Vol. 24, № 12. P. 2741–2748.
60. Singh S.K. et al. Amine-modified graphene: Thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications // ACS Nano. 2012. Vol. 6, № 3. P. 2731–2740.
61. Papi M. et al. Plasma protein corona reduces the haemolytic activity of graphene oxide nano and micro flakes // RSC Adv. Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 5, № 99. P. 81638–81641.
62. Matuszewska A. et al. Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor* // PLoS One. 2018. Vol. 13, № 6. P. 1–14.
63. Singh S.K. et al. Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets // ACS Nano. American Chemical Society, 2011. Vol. 5, № 6. P. 4987–4996.
64. Ding Z., Ma H., Chen Y. Interaction of graphene oxide with human serum albumin and its mechanism // RSC Adv. Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 4, № 98. P. 55290–55295.
65. Bengtson S. et al. No cytotoxicity or genotoxicity of graphene and graphene oxide in murine lung epithelial FE1 cells *in vitro* // Environ. Mol. Mutagen. John Wiley and Sons Inc., 2016. Vol. 57, № 6. P. 469–482.
66. Hashemi E. et al. Synthesis and cyto-genotoxicity evaluation of graphene on mice spermatogonial stem cells // Colloids Surfaces B Biointerfaces. Elsevier B.V., 2016. Vol. 146. P. 770–776.
67. Gurunathan S. et al. Evaluation of graphene oxide induced cellular toxicity and transcriptome analysis in human embryonic kidney cells // Nanomaterials. MDPI AG, 2019. Vol. 9, № 7.